

**Computergestützte Leitstruktursuchen in
Moleküldatenbanken
am Beispiel
der humanen Carboanhydrase II**

Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

dem
Fachbereich Pharmazie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Sven Grüneberg
aus
Marburg/Lahn

Marburg/Lahn, im November 2000

Vom Fachbereich Pharmazie der Philipps-Universität Marburg/Lahn als Dissertation

angenommen am: 13.11.2000

Erstgutachter: Prof. Dr. G. Klebe

Zweitgutachter: Prof. Dr. K.-H. Röhm

Tag der mündlichen Prüfung: 18.12.2000

FÜR SILKE

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	5
1.1	Carboanhydrasen	8
1.2	Glaukom	10
1.3	Struktur der humanen Carboanhydrase II	13
1.3.1	Sekundär- und Tertiärstruktur	13
1.3.2	Aktives Zentrum	14
1.3.3	Katalytischer Mechanismus	15
1.4	Inhibitoren der Carboanhydrase II	18
1.4.1	Anionen als Inhibitoren	18
1.4.2	Inhibierung der humanen CAII durch Inhibitoren der Sulfonamid-Klasse	18
1.4.3	CAII-Inhibitoren in der Therapie	19
1.4.4	CAII-Inhibitoren in der Glaukomtherapie	20
1.4.5	PLS-Konzept	24
1.4.6	Hydroxamate	27
1.5	Rationales Wirkstoffdesign	29
1.5.1	Allgemeine Erkenntnisse	29
1.5.2	2D-Überlagerung- und Suchverfahren	30
1.5.3	3D-Überlagerungs- und Suchverfahren	32
1.5.4	Docking-Verfahren	36
1.5.5	Bewertung (Scoring)	39
2	Material und Methoden	42
2.1	Biochemische Methoden	42
2.1.1	Chemikalien	42
2.1.2	Aufbereitung des Proteins	42
2.1.3	Quantitative Gehaltsbestimmung des Proteins	43
2.1.4	<i>In vitro</i> Enzymassays der Carboanhydrase II	43
2.2	Proteinstrukturaufklärung	47
2.2.1	Kristallisation der humanen CAII	47
2.2.2	Soaking von CAII-Kristallen mit Inhibitoren	48
2.2.3	Sammlung von Datensätzen	49
2.2.4	Verfeinerung der Datensätze	49
2.3	Datenbanksuchverfahren	51
2.3.1	UNITY	51
2.3.2	RIGFIT und FLEXS	52
2.3.3	FLEXX	56
2.4	Bewertungsfunktionen	59
2.4.1	Bewertungsfunktion in FLEXX	59

2.4.2	DRUGSCORE	60
2.5	Methoden zur Analyse von Proteinbindetaschen	62
2.5.1	GRID	62
2.5.2	SUPERSTAR	64
2.5.3	LUDI	65
2.6	Flexibilitätsanalyse	66
2.6.1	RELIBASE+	66
2.7	Wasser	68
2.7.1	MOLOC und MAB	69
2.8	Datenbanken	70
2.8.1	MAYBRIDGE	70
2.8.2	LEADQUEST	71
3	Ergebnisse und Diskussion	72
3.1	Virtuelles Screening	72
3.1.1	Testdatensatz	74
3.1.2	Optimierung der Datenbanken	80
3.1.3	Auswahl von Komplexstrukturen der HCAII	88
3.1.4	Analyse der Bindetasche	92
3.1.5	Ableitung eines Pharmakophormodells	97
3.1.6	Ergebnisse der 3D-Suchen mit UNITY	99
3.1.7	Superpositionierung	100
3.1.8	Docking	106
3.1.9	Auswahl der Vorschläge	107
3.1.10	Allgemeine Analyse der Vorschläge	126
3.2	IC₅₀-Werte der vorgeschlagenen Verbindungen	128
3.3	Strukturelle Validierung der vorgeschlagenen Bindungs-modi	133
3.3.1	Kristallographische Charakterisierung des 0134-36/BTB03218-CAII-Komplexes	133
3.3.2	Kristallographische Charakterisierung des 2000-07790-CAII-Komplexes	136
4	Zusammenfassung und Ausblick	142
5	Literaturverzeichnis	150
6	Danksagung	166

1 Einleitung

Die Entdeckung von neuen und innovativen Leitstrukturen ist einer der Schlüsselschritte bei der Entwicklung eines Wirkstoffes. Dementsprechend werden große Anstrengungen unternommen, diesen Prozeß durch die Neu- und Weiterentwicklung verschiedener Techniken zu optimieren, besonders im Hinblick auf die Entwicklungszeiten von bis zu 15 Jahren und Kosten von einer halben Milliarde US-Dollar pro Medikament.

In den letzten Jahren ist unter massivem apparativem Aufwand die experimentelle Hochdurchsatztestung (HTS, *High-Throughput Screening*) etabliert und weitgehend automatisiert worden (Houston & Banks, 1997). Ein Verfahren, das durch die Miniaturisierung und Automatisierung von *in vitro*-Bioassays eine zufällige Suche nach Leitstrukturen (*Random Screening*) erheblich beschleunigt. Allerdings stellt die Entwicklung und Modifizierung der Bioassays und die Bereitstellung großer Substanzbibliotheken, trotz kombinatorischer Chemie und automatisierter Parallelsynthesen, eine kosten- und zeitintensives Unternehmen dar. Die mangelnde Qualität der gefundenen Verbindungen (Treffer), von denen sich eher ein geringer Anteil in Leitstrukturen umwandeln läßt, ließen die anfangs sehr optimistischen Erwartungen in eine realistische, in Ansätzen sogar pessimistische Einschätzung umschlagen (Lahana, 1999). Gründe hierfür sind in der Problematik zu sehen, daß bei dieser ungerichteten Vorgehensweise oft falsch positive Treffer auftreten. Dabei handelt es sich um Verbindungen, die durch eine vorgetäuschte unspezifische Bindung als vermeintliche Treffer erscheinen, aber letztendlich ohne spezifische Wirkung bleiben.

Für ein erfolgreiches Medikament werden in der präklinischen Phase ungefähr 5000 Verbindungen im Labor auf ihre biologische Aktivität und Toxizität zunächst in der Zelle und schließlich auch am Tier getestet. Im Durchschnitt bleiben weniger als fünf Verbindungen übrig, die den Weg in die klinischen Phasen (Testung am Mensch) antreten. Schließlich schafft es dann nur eine Verbindung, als Medikament am Markt

zugelassen zu werden^a. Die Optimierung dieses langwierigen und kostenintensiven Prozesses der Wirkstoffsuche ist daher von großer ökonomischer Bedeutung.

So stellt sich die Frage, ob Computermethoden inzwischen in der Lage sind, HTS-Verfahren - nicht zu ersetzen – aber als Komplement bei der Suche nach neuen Leitstrukturen gezielt zu unterstützen? Die Voraussetzungen für eine computergestützte Suche nach Leitstrukturen in Moleküldatenbanken (*Virtual Screening*) (Walters *et al.*, 1998) sind völlig gegensätzlich zu denen des HTS. Das HTS ist eine Technologiegetriebene Methode und beruht auf dem Nachweis der Wechselwirkung mit dem Zielprotein (*target*) von einer Anzahl strukturell teilweise extrem diverser Treffer. Das Verständnis, warum die gefundenen Treffer mit dem Target interagieren können, fehlt jedoch völlig. Das Computerscreening dagegen ist ein Erkenntnis-getriebenes Verfahren, das nur dann eingesetzt werden kann, wenn das Wissen um die Bindung an ein Target vorhanden ist. Es liefert somit die Gründe für eine Wechselwirkung mit dem Target automatisch mit. Der sehr komplexe Vorgang der Bindung eines Liganden an ein Protein ist bisher jedoch nur teilweise verstanden (Böhm & Klebe, 1996). Die Frage, ob die heute entwickelten Computerprogramme bereits eine Zuverlässigkeit erreicht haben, die ein solches Computerscreening aussichtsreich erscheinen lassen, wird in der vorliegenden Arbeit am Beispiel der humanen Carboanhydrase II (HCAII) untersucht. Als eine Modellstudie wurde für dieses Enzym in Moleküldatenbanken nach neuen Leitstrukturen gesucht. Ziel und Motivation dieser Arbeit bestanden in der Entwicklung einer computergestützten Suchstrategie, aber auch in der Testung und Weiterentwicklung bestehender Computerverfahren, sowie in der abschließenden experimentellen Validierung der durch die angewandten Filterschritte erhalten Leitstrukturen.

Sicherlich ist auch heute nur bei einer eher geringen Zahl der Targets eine Raumstruktur gegeben, doch die Etablierung sogenannter Proteinstrukturfabriken^b, aber auch die technologischen Fortschritte auf den Gebieten, der NMR-Spektroskopie und der Proteinkristallisation zur Röntgenstrukturanalyse, werden diese Situation in Zukunft verändern. Die Automatisierung der Proteinkristallisation ist enorm verbessert worden. Robotersysteme sind heute in der Lage über 138.000 Kristallisationsansätze pro Tag anzusetzen und über eine Millionen Ansätze pro Tag nach Kristallen zu durchmustern (Wilson, 2000). Moderne Methoden zur Suche nach neuen Zielproteinen, vor allem in Zukunft mitbestimmt durch die Resultate des Genom-

^a Quelle: Tufts Center for the Study of Drug Development, Tufts University, Boston, USA

^b Die Proteinstrukturfabrik (PSF) gründet auf einem Zusammenschluß mehrere deutscher Institute und Firmen, mit dem Ziel eine Infrastruktur zu schaffen, hocheffizient und in großer Zahl die Ergebnisse aus verschiedenen Genomsequenzierungsprojekten in Proteinstrukturen umzusetzen.

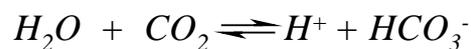
sequenzierungsprogramms HUGO (*human genome project*) (Burley *et al.*, 1999), lassen insgesamt ein deutliches Anwachsen der Zahl interessanter Targets für neue Therapieansätze erwarten. Eine große Anzahl weiterer Projekt zur Sequenzbestimmung, z.B. mikrobieller Genome, geben zusätzliche Angriffspunkte zur Behandlung mikrobiell verursachter Krankheiten.

Wenn also eine derartige Flut von Strukturen in Kürze bereitstehen wird, sollten bis dahin „Werkzeuge“ entwickelt sein, die eine detaillierte Analyse der Proteinbindetasche erlauben, um daraus eine geeignete Suchanfrage an eine Moleküldatenbank zu richten. Ein großer Vorteil der *virtuellen* Suche gegenüber dem HTS besteht darin, daß die durchzumusternden Verbindungen in Substanz noch nicht vorzuliegen haben, eine Synthese kann hierbei erst zu einem späteren Zeitpunkt erfolgen. Zum Übersetzen der Protein-Eigenschaften in eine Suchanfrage konnten in dieser Arbeit eine Reihe neuer Strategien entwickelt und gegeneinander abgewogen werden. Anschließend erfolgt eine stufenweise Reduktion der aus den Datenbanken gewonnen Leitstrukturkandidaten. Unterschiedliche Filter kommen zum Einsatz, die im Hinblick auf molekulare Ähnlichkeit, das Einpassen von Liganden in eine Proteinbindetasche (*Docking*) und das Abschätzen von Bindungsaffinitäten eine ausreichende Zuverlässigkeit erzielen. Nach der experimentellen Validierung der erhaltenen Leitstrukturen durch einen *in vitro*-Enzymassay fand eine röntgenkristallographische Untersuchung von Leitstrukturen im Komplex mit der humanen CAII statt, um die Vorhersagekraft der zum Docking eingesetzten Verfahren zu überprüfen.

In dem folgenden Kapitel werden zunächst die humane Carboanhydrase im allgemeinen, deren Struktur und Funktion sowie das mit ihr verbundene Krankheitsbild Glaukom vorgestellt. Desweiteren werden bereits bekannte Inhibitoren und Wirkstoffe der humanen CAII beschrieben, die als Glaukomtherapeutika entwickelt wurden. Im Anschluß daran wird ein Überblick über die bekannten Methoden zum computergestützten Wirkstoffdesign gegeben. Kapitel 2 faßt die in dieser Arbeit verwendeten Materialien und angewandten Methoden zusammen und die aus dieser Arbeit resultierenden Ergebnisse werden dann in Kapitel 3 vorgestellt und diskutiert.

1.1 Carboanhydrasen

Die Carboanhydrasen (CA) (EC 4.2.1.1) gehören zu der Klasse der Hydrolyasen (Dehydratasen). Sie kommen ubiquitär in allen Tieren und Pflanzen vor und konnten auch in einigen Bakterien nachgewiesen werden. Das Zinkionen-haltige Enzym hat ein Molekulargewicht von 28–30kDa und katalysiert die reversible Reaktion der Hydratation von CO₂:



In einem deutlich geringerem Maße werden auch die Wasseranlagerung an Aldehyde und die Hydrolyse von Estern (Verpoorte *et al.*, 1967) katalysiert. Die vertebralen Carboanhydrasen regulieren durch die Hydratation von CO₂ das Säure-Base-Gleichgewicht im Blut und ermöglichen den für die Atmung wichtigen Abtransport von Kohlendioxid als Hydrogencarbonat.

Insgesamt sind 14 verschiedene Isoenzyme bzw. homologe Enzyme der humanen Carboanhydrasen bekannt (Supuran & Scozzafava, 2000), davon sind sieben (I-VII) sehr gut untersucht und beschrieben. Diese gleichen sich in der Zahl an Aminosäuren von 260 und bilden jeweils ein Proteinmonomer. Die unterschiedlichen Isoenzyme sind im Körper in verschiedenen Organen lokalisiert (Lindskog, 1997)(Tabelle 1).

Die humane Carboanhydrase II (HCAII) (Roughton, 1935) ist in vielen Organen des menschlichen Körpers lokalisiert. Sie ist auch in den Erythrozyten zu finden, wodurch ein Einfluß auf den pH-Wert des Blutes erklärt wird. Die meisten CO₂-Moleküle, die während der Respiration erzeugt werden, erfordern CAII-katalysierte Reaktionen für den Transport aus der Zelle. Die CAII liefert die Transportform HCO₃⁻ aus CO₂ in den Erythrozyten. Ohne Carboanhydrasen wäre die Hydratisierung 100mal langsamer und im Blut und dem Gewebe könnte gasförmiges CO₂ freigesetzt werden (Voet & Voet, 1992). Das herausragende Charakteristikum der CAII ist ihre Effektivität. Mit einer Umsatzrate von 10⁶s⁻¹ gehört sie zu den schnellsten bisher untersuchten Enzymen (Khalifah, 1971). Der pH-Bereich, in dem die Aktivität am größten ist, liegt zwischen 7 und 9. Die Richtung der Reaktion ist pH-abhängig, so wird bei einem pH-Wert von über 7 überwiegend die Hinreaktion katalysiert und bei einem pH-Wert von unter 7 die Rückreaktion (Silverman *et al.*, 1976).

Tabelle 1 *Isoenzyme der humanen Carboanhydrase und ihrer Verteilung in den verschiedenen Organen*

Isoenzym	Vorkommen im Körper
CAI	Erythrozyten
CAII	Erythrozyten Augen Osteoklasten und Chondrozyten der Knochen Gliazellen in neutralen Tumoren
CAIII	roten Muskelfasern, Fettzellen (Adipozyten)
CAIV	Membran gebunden, an der Plasmaseite von kapillaren Endothelzellen: - der Nierezellen - der Lungenzellen - der Leberfunktionszellen (Leberparenchymzellen)
CAV	Mitochondrien
CAVI	Speichel
CAVII	Speicheldrüsen

1.2 Glaukom

Eine Schlüsselrolle spielt die humane CAII bei der Regulierung des Augeninnendruckes in den Ziliarkörperfortsätzen der Augen (Wistrand, 1951) durch die Produktion von Kammerwasser. Ein pathologisch erhöhter intraokularer Druck (IOD) von über 21mmHg ist ein Symptom für die Augenkrankheit *Glaukom* bzw. „*Grüner Star*“. Das Glaukom stellt eine Erkrankung dar, welche zu einer progressiven Schädigung des Sehnervs und dem Verlust der visuellen Funktion führt (Pfeiffer, 1998). Es wird angenommen, daß 7 Millionen Menschen weltweit an *Glaukom* erkrankt sind und behandelt werden müssten. Ein Teil dieser Patienten ist bereits an der Erkrankung erblindet. Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) geht davon aus, daß die Glaukome auch im 21. Jahrhundert Ursache für 20% aller Erblindungen auf dieser Erde sein werden. Für die USA wird postuliert, daß 50% aller Patienten ihre Glaukomerkrankung nicht kennen und dadurch etwa 120.000 Amerikaner jedes Jahr ihr Sehen verlieren, während weitere 900.000 Patienten eine Verschlechterung ihrer Erkrankung erfahren. Es wird geschätzt, daß in Deutschland ein bis zwei Prozent aller 40jährigen ein *Glaukom* haben. Dies entspräche etwa 500.000 bis 800.000 Patienten allein in Deutschland. Die Prävalenz nimmt mit dem Alter stark zu und beträgt bei den über 80jährigen etwa 14%. Bei nicht rechtzeitiger Behandlung des *Glaukoms* kommt es zu einer Zerstörung des Sehnerves, die zur Erblindung führt. Die Ursache für diese Krankheit sind noch unbekannt, aber eine Früherkennung verbessert die Heilungschancen (Diestelhorst, 1997).

Ein erhöhter IOD entsteht beim *Glaukom* fast immer durch eine Abflußbehinderung des Kammerwassers und führt durch mechanische Veränderung des Sehnervs und/oder Störung der Durchblutung zu einem Sehnervenschaden. Je nachdem ob die Drucksteigerung als erstes Zeichen einer Augenkrankheit auftritt oder ob die Erhöhung des IOD die Folge einer bestehenden oder vorausgegangenen Augenerkrankung, z.B. einer okularen Entzündung, ist, spricht man von einem *primären* oder *sekundären Glaukom*. Ersteres wird nach der Weite des Kammerwinkels nochmals in das *Weitwinkel-* und *Engwinkelglaukom* unterteilt. Beim *Weitwinkelglaukom (Glaucoma simplex)*, der häufigsten Glaukomform beim Erwachsenen, kann das Kammerwasser infolge einer strukturellen Veränderung des Trabekelwerks dieses nur schwer passieren. Es wird angenommen, das Zellabbauprodukte und Pigmentablagerungen das Trabekelwerk verstopfen. Das Trabekelwerk ist ein schwammartiges Gebilde, das den Kammerwinkel auskleidet. Der Kammerwinkel beschreibt den Bereich im Auge, der

den Übergang zwischen Hornhaut, Lederhaut und Netzhaut darstellt (Abbildung 1). Ein erhöhter Widerstand im Schlemmschen Kanal sowie eine Drucksteigerung in den Venen, die das Kammerwasser ableiten, stellen zusätzliche Abflußbarrieren dar. Beim *Engwinkelglaukom* beruht die Steigerung des intraokularen Druckes auf einem engen Kammerwinkel und einem daraus folgenden erschwerten Kammerwasserabfluß.

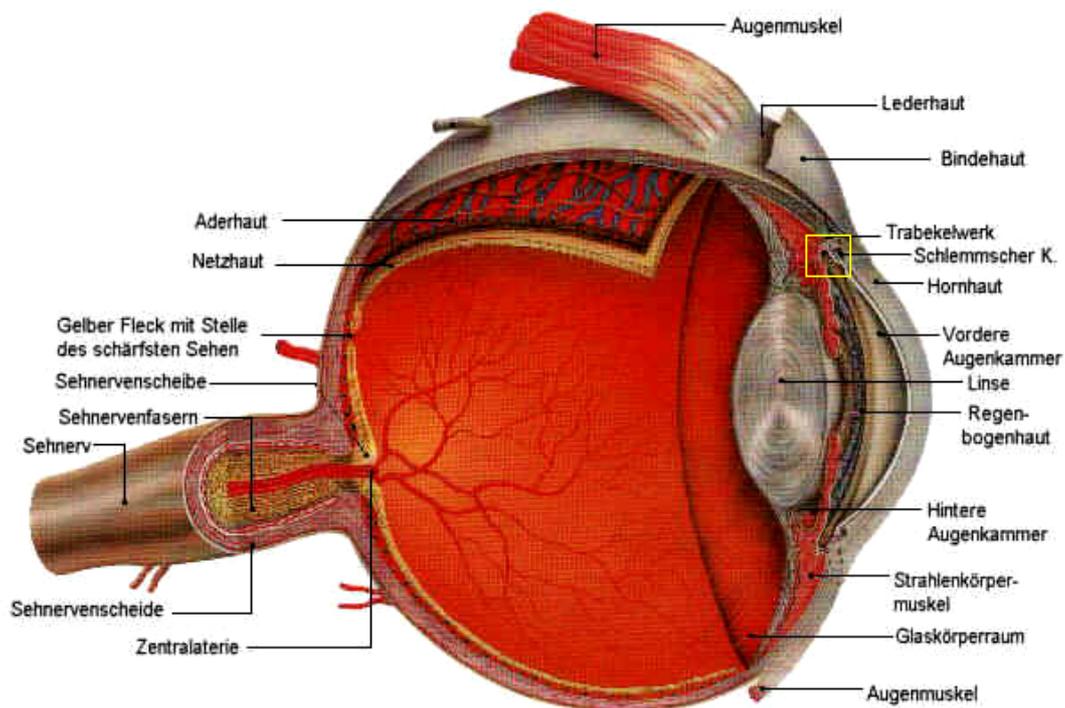


Abbildung 1 *Querschnitt eines menschlichen Auges. Der Bereiche an dem sich das Trabekelwerk und der Kammerwinkel befindet, ist durch den gelben Kasten hervorgehoben. Ebenfalls in diesem Bereich ist der Schlemmsche Kanal zu sehen.*

Kommt es zu einer vollständigen Verlegung der Abflußwege, entsteht ein akutes „Winkelblockglaukom“ mit Druckwerten von 60-80mmHg, starken Kopfschmerzen, Übelkeit und Erbrechen (*akuter Glaukomanfall*). Als Folge des stark erhöhten IOD können Ödeme im Hornhautepithel sowie Mangeldurchblutung der Netzhaut auftreten, wodurch das Sehvermögen erheblich herabgesetzt werden kann (Mutschler, 1997; Thews *et al.*, 1991).

Zur Therapie dieser Krankheiten werden medikamentöse Drucksenkungspräparate eingesetzt. Zur Verfügung stehen lokal applizierte Parasympathomimetika, Sympathomimethika und β -Blocker (β -Adrenorezeptoren blockierende Substanzen), die aber aufgrund von starken Nebenwirkung, Kontraindikationen und Allergien nur

bedingt zur Behandlung geeignet sind (Pfeiffer, 1998). Als Therapeutika werden somit hauptsächlich Carboanhydrase-Inhibitoren aus der Substanz-Klasse der Sulfonamide (Kapitel 1.4) eingesetzt, die die humane CAII inhibieren, was zur einer 25-30% Abnahme des IOD beim Menschen führt (Maren, 1995).

Der CAII-Inhibitor Acetazolamid (Diamox[®]) (Maren, 1987)(Kapitel 1.4) führt oral und intravenös verabreicht jedoch zu starken systemischen Nebenwirkungen (Appetitlosigkeit, Müdigkeit, Depression, gastrointestinale Störungen, Nierensteinbildung, Elektrolytverschiebung, metabolische Azidose und Blutbildstörungen aller Zelltypen). Der Grund hierfür ist die ubiquitäre Verteilung der Carboanhydrase im menschlichen Körper. Aufgrund dieser systemischen Nebenwirkungen lag der Gedanke nahe, Carboanhydrase-Inhibitoren topisch zu verabreichen, doch eine ungenügende Penetration des Auges machte eine Weiterentwicklung der bis dahin verwendeten Carboanhydrase-Inhibitoren notwendig (Maren *et al.*, 1983). So gibt es heute mittlerweile zwei Wirkstoffe am Markt, Dorzolamid (Trusopt[®]) (Surgue *et al.*, 1997) und Brinzolamid (Azopt[®]) (Silver, 1998) (Kapitel 1.4), die topisch appliziert werden. Aufgrund einer Wasser- und Fettlöslichkeit sind sie als Ampholyt in der Lage, in das menschliche Auge zu diffundieren und dort gezielt die CAII zu inhibieren. Auch diese Inhibitoren sind nicht frei von Nebenwirkungen (Surgue, 2000), so daß intensiv die Weiterentwicklung dieser Substanzen vorangetrieben wird (Supuran & Scozzafava, 2000).

1.3 Struktur der humanen Carboanhydrase II

1.3.1 Sekundär- und Tertiärstruktur

Das globuläre Protein CAII ist ellipsenförmig und hat die Maße 55 x 44 x 39 Å. An der Primärstruktur der CAII sind 260 Aminosäuren beteiligt. Die Aufklärung der Tertiärstruktur hat ergeben (Liljas *et al.*, 1972), daß das Protein aus nur einer Domäne besteht. Das bestimmende Sekundärstrukturelement ist ein 10-strängiges, leicht verdrehtes β -Faltblatt, daß das Protein in zwei Hälften teilt. Bis auf zwei parallele Paare ist das β -Faltblatt antiparallel. Einige wenige kurze α -Helices befinden sich an der Oberfläche der CAII (Abbildung 2).

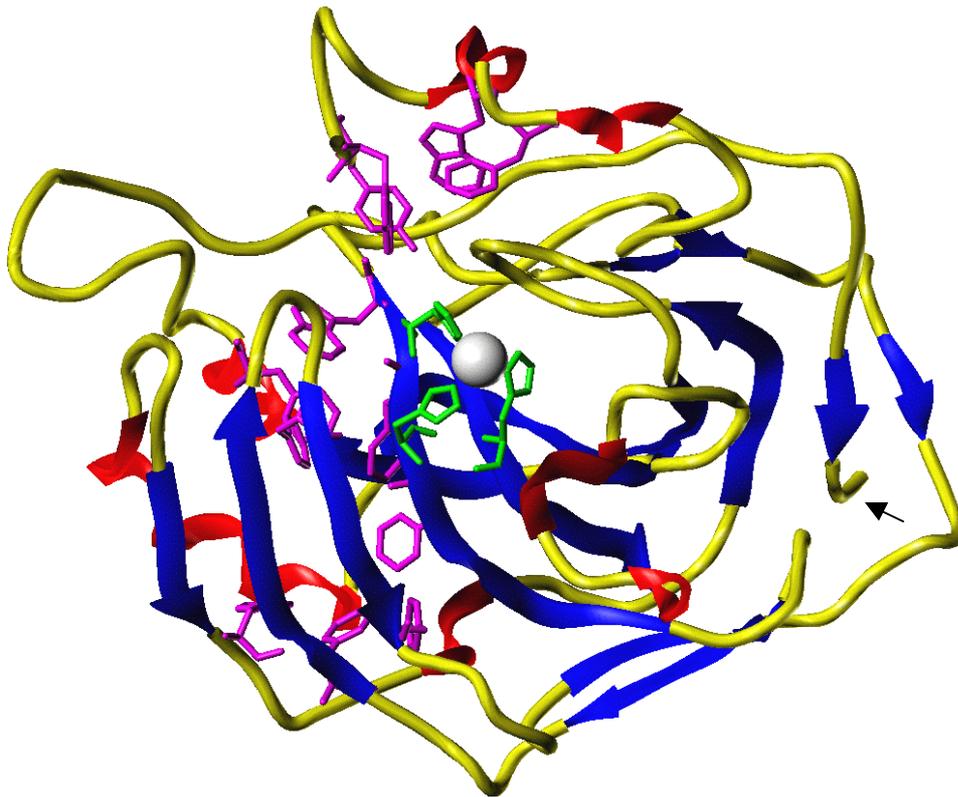


Abbildung 2 Darstellung der Tertiärstruktur von humaner CAII. α -Helices und β -Faltblätter werden durch rote Schleifen bzw. blaue Pfeile wiedergegeben. Das durch drei Histidine (gelb) gebundene Zinkion ist als graue Kugel dargestellt. Eine Besonderheit der Struktur ist, daß der C-Terminus durch eine Schleifenebene der Polypeptidkette geht und dadurch im Ansatz einen "Knoten" beschreibt (Pfeil). Die in violett hervorgehobenen Aminosäuren zeigen die Positionen der zwei aromatischen Cluster innerhalb der CAII.

Die Aufklärung der Tertiärstruktur zeigt, daß keine Disulfid-Brücken existieren. Alle Lys-Reste sind an der Oberfläche des Enzyms lokalisiert und stehen mit den Seitenketten der Nachbarmoleküle in Verbindung. Es treten zwei Bereiche im Faltungsmuster der CAII auf, in denen aromatische Aminosäuren einen Cluster bilden. Der eine Cluster wird von den vier aromatischen Aminosäuren Trp-5, Trp-7, Trp-16 und Phe-20 gebildet und der andere durch die 8 Reste Phe-66, Phe-70, Phe-93, Phe-95, Phe-176, Phe-179, Phe-226 und Trp-97 (Abbildung 2). Der letztere Cluster liegt konserviert in der Carboanhydrase I und zu Großteilen auch in der Carboanhydrase III vor (Eriksson *et al.*, 1988).

1.3.2 Aktives Zentrum

Das aktive Zentrum ist amphiphil. Wenn kein Ligand gebunden ist, ist es von einem Netzwerk Wasserstoffbrücken-gebundener Wassermoleküle durchzogen. Über diese Wassermoleküle steht es mit dem umgebenden Medium in Verbindung. Am Boden einer 15Å tiefen, kegelförmigen Bindetasche ist Zink als Zentralatom verankert. Zwei Histidin-Seitenketten von His-94 und His-96 sind über ihre N_ε-Atome, sowie eine His-119 über sein N_δ-Atom am Zink koordiniert. Über die primären Histidin-Liganden steht Zink mit vier weiteren Aminosäuren in direkten Kontakt. His-94 (N_δ1) bildet dabei mit dem Sauerstoffatom des Gln-92-Restes (O_ε1) eine Wasserstoffbrückenbindung (Abstand 2.7Å), ebenso His-119 (N_ε2) mit der Carboxylseitenkette des Glu-117 (O_ε2) (Abstand 2.6Å). His-96 (N_δ1) tritt über eine Wasserstoffbrückenbindung mit dem Carbonyl-Sauerstoff des Rückgrats von Asn-244 (Abstand 2.7Å) in Wechselwirkung (Christianson & Fierke, 1996) (Abbildung 3). Ein Wassermolekül (H₂O 263), das vermutlich als OH⁻-Ion vorliegt, vervollständigt als vierter Ligand den Komplex am Zinkatom zu einem verzerrten Tetraeder (Merz & Banci, 1997; Silverman & Lindskog, 1988). In dem konisch zulaufenden aktiven Zentrum befindet sich ein weiteres Wassermolekül, das sogenannte „deep water“, welches auch Wasser W338 genannt und in der Enzymreaktion durch CO₂ verdrängt wird (Abbildung 3) (Eriksson *et al.*, 1988).

Die für die katalytische Reaktion entscheidende Aminosäure ist Thr-199. Sie stabilisiert mit ihrer Hydroxyl-Gruppe das am Zink gebundene Hydroxid-Ion über eine Wasserstoffbrückenbindung. Zusätzlich geht sie eine Wasserstoffbrückenbindung mit dem an Glu-106 gebundenen Substrat CO₂ ein (Kapitel 1.3.3). Val-121, Val-143 und Val-207 ergeben zusammen mit Trp-209, Thr-200, Glu-106, Thr-199 und His-64 die Bindetasche, von der das Substrat räumlich umgeben wird. Betrachtet man die gesamte amphiphile Bindetasche, so lassen sich die Aminosäuren entsprechend ihrer hydrophoben und hydrophilen Eigenschaften in zwei Gruppen einteilen. Zur Gruppe der hydrophoben Aminosäuren zählen: Ile-91, Val-121, Phe-131, Val-135, Leu-141,

Val-143, Leu-198, Pro-202 und Leu-204. Die hydrophilen Aminosäuren der Bindetasche sind: Tyr-7, Asn-62, His-64, Asn-67, Gln-92, His-94, His-96, Glu-106, Glu-117, His-119, Thr-199 und Thr-200 (Abbildung 3).

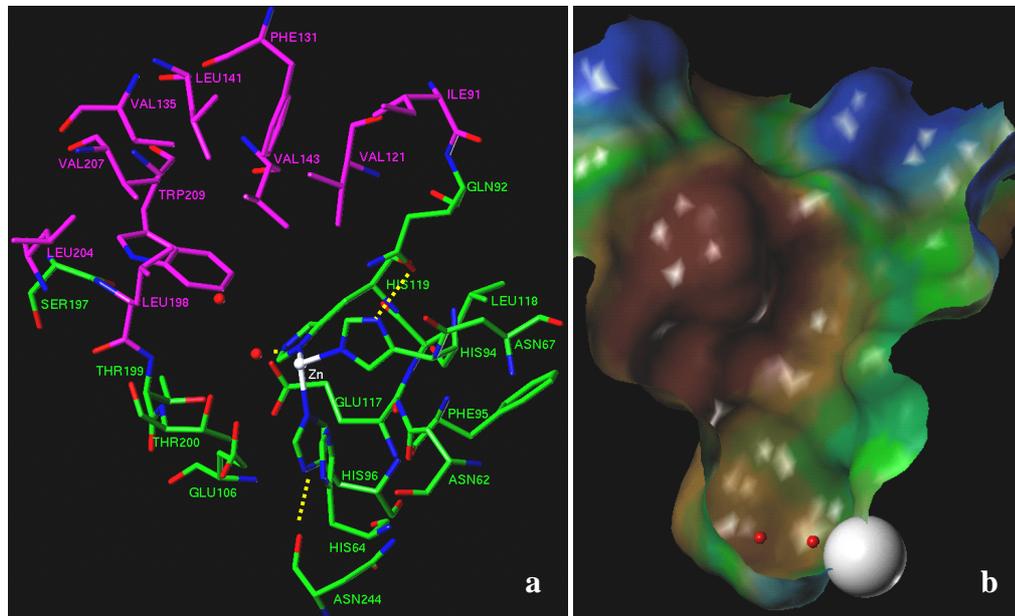


Abbildung 3 In der **Abbildung 3a** sind die hydrophoben Aminosäuren (grün) und die hydrophilen Aminosäuren (violett) der amphiphilen Bindetasche zu sehen. Weiterhin sind die Zink-chelatierenden Histidin-Seitenketten mit ihren Wasserstoffbrückenbindungen zu den sekundären Aminosäuren dargestellt (gelbe, gestrichelte Linien). Als rote Kugeln sind die Sauerstoffatome des "deep water" und des Zink-gebundenen Hydroxidion zu erkennen. **Abbildung 3b** zeigt die Lösungsmittel-zugängliche Connolly-Oberfläche der Bindetasche von CAII mit dem Zinkion als graue Kugel am Boden der konischen Tasche. Eingefärbt ist die Tasche entsprechend der hydrophoben (braun) und hydrophilen (grün) Aminosäuren aus **Abbildung 3a**.

Das Zink-Atom des Apo-Enzyms kann durch eine Vielfalt von Metall-Ionen ersetzt werden. Nur das Co(II)-haltige Protein hat eine vergleichbar hohe Aktivität wie das native Zink-Enzym (ca.50%). Cu, Fe, Ni und Mn zeigen eine kleinere oder keine Aktivität trotz der Ähnlichkeit von Ladung, Größe und pK-Wert zu Zn (Hakansson & Wehnert, 1992).

1.3.3 Katalytischer Mechanismus

Beim katalytischen Reaktionsablauf spielt das Zink-Atom (Zn^{2+}) die zentrale Rolle. Die besonders hohe Umsetzungsgeschwindigkeit beruht auf der räumlichen Nähe aller beteiligten Edukte. Kontrovers wird in der Literatur der eigentliche katalytische Mechanismus diskutiert (Hakansson *et al.*, 1992; Jackman *et al.*, 1996; Kiefer & Fierke,

1994; Silverman & Lindskog, 1988). Im Mittelpunkt der Diskussion stehen der Transfer der Protonen und der Bindungsmodus des Hydrogencarbonats an das Zink. Röntgen-kristallographische Methoden lassen eine Untersuchung des nur sehr kurzlebigen Katalysevorganges nicht zu. Umfangreiche Mutationsstudien bestätigen (Alexander *et al.*, 1991; Behravan *et al.*, 1990; Kiefer *et al.*, 1993; Krebs *et al.*, 1991; Nair *et al.*, 1991; Nair & Christianson, 1993), unterstützt durch Untersuchungen mit QM/MM-Methoden^a (Merz & Banci, 1997; Toba *et al.*, 1999), den folgenden, von Lindskog (Lindskog, 1997) vorgeschlagenen Mechanismus (Abbildung 4).

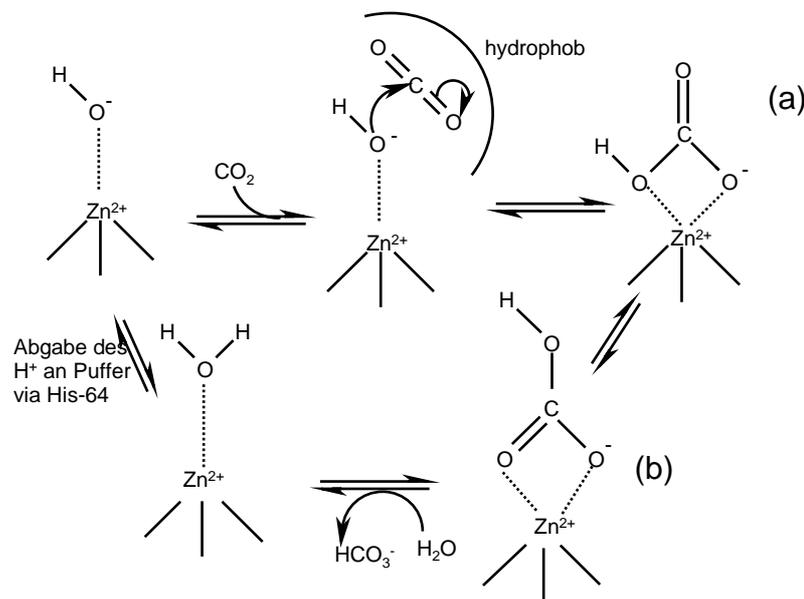


Abbildung 4 Schematische Zusammenfassung des katalytischen Mechanismus der humanen CAII. Das Zink-gebundene Hydroxidion attackiert das in der hydrophoben Tasche lokalisierte Kohlenstoffatom des CO_2 zur Bildung eines Hydrogencarbonates. (a) Vermutete Struktur und Bindungsmodus des entstanden Hydrogencarbonates. (b) Angenommen Isomerisierung des Hydrogencarbonates, gefolgt von dem Austausch durch Wasser. Anschließende Regenerierung des Zink-Wasser-Komplexes zu einem OH^- -Zink-Komplex durch den Transport und die Abgabe des Protons an das Lösungsmittel über His-64.

Die für die Katalyse wichtigen Seitenketten sind auf der hydrophilen Seiten der Bindetasche Thr-199, Glu-106 und His-64 und auf der hydrophoben Seite Val-121, Val-143, Leu-198, und Trp-209. Diese hydrophoben Reste bilden eine Tasche, die der Aufnahme von CO_2 , respektive Wasser („deep water“) dient (Abbildung 4). Die hohe Umsetzungsgeschwindigkeit wird u.a. damit erklärt, daß das desolvatisierte CO_2 -Molekül zunächst nur lose in dieser hydrophoben Tasche bindet und erst im

^a QM/MM-Methoden: Quantenmechanische/Molekularmechanische Methoden (Gao, 1995).

Übergangszustand $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ eine Wechselwirkung mit der NH-Gruppe von Thr-199 eingeht. Schwache polare Wechselwirkungen mit Zn^{2+} dienen der Orientierung des CO_2 -Moleküls in der Tasche, dabei wird allerdings das Zink-gebundene OH^- -Ion nicht durch CO_2 verdrängt. HCO_3^- entsteht durch den nukleophilen Angriff des Zink-gebundenen OH^- an das immobilisierte CO_2 . Es wird weiterhin angenommen, daß Thr-199 bei dem Mechanismus eine Art „Türsteher“-Rolle übernimmt. Die Hydroxylgruppe des Thr-199 läßt nur solche Anionen an das Zink binden, die in der Lage sind, ein Proton für eine Wasserstoffbrückenbindung mit dem Seitenketten-Sauerstoffatom von Thr-199 zu liefern (Christianson & Fierke, 1996), durch eine starke Wasserstoffbrücke des Hydroxylprotons mit dem Carboxylsauerstoffatom von Glu-106 (Merz, 1991) ist Thr-199 ein guter Wasserstoffbrückenakzeptor. Verschiedene Mutationen von Thr-199 haben gezeigt, daß diese zu einer Stabilisierung des Hydrogencarbonat-Zink-Komplexes führen (Krebs & Fierke, 1993). Dies steht in Einklang mit der Annahme, daß gerade Thr-199 eine Destabilisierung des Hydrogencarbonat-Zink-Komplexes und somit eine effiziente und schnelle Dissoziation des gebundenen HCO_3^- aus der Bindetasche bewirkt. Man nimmt an, daß dies den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt darstellt. Durch Angriff eines Wassermoleküls wird schließlich das Hydrogencarbonat freigesetzt. Dieses Wassermolekül dient nach Abgabe eines Protons erneut der Hydratation von CO_2 .

Hierbei fungiert His-64 über die Wassermoleküle W292 und W318 als „Protonen-Shuttle“ und entläßt das aufgenommene Proton an das umgebende Puffersystem. His-64 ist 7.5\AA von Zn^{2+} entfernt (Eriksson *et al.*, 1988; Hakansson *et al.*, 1992). Eine pH-Wert abhängige Änderung der Konformation von His-64 konnte von Nair und Christianson (Nair & Christianson, 1991a; Nair & Christianson, 1991b) gezeigt werden. Kristallstrukturen, die bei pH-Werten von 5.7, 6.5, 8.5 und 9.5 erhalten wurden, zeigen, daß bei pH 5.7 die Seitenkette deutlich aus dem aktiven Zentrum rotiert. Die hohe pH-abhängige Mobilität des Restes stützt die Annahme, daß His-64 als „Protonen-Shuttle“ dient. Studien mit Mutanten, deren Aminosäure an Position 64 ausgetauscht wurde, demonstrieren, daß Histidin die Reaktion von CO_2 zu HCO_3^- am besten katalysiert, indem es die aktive Form Zn-OH^- regeneriert und am wenigsten von der Stärke des Puffers abhängig ist (Lindskog, 1997). Die k_{cat} -Werte sind pH-abhängig, was durch Veränderungen des Puffermediums gezeigt werden konnte (Silverman & Lindskog, 1988). Bei einem pH-Wert von annähernd 9 ist die Lys-64-Mutante um das fünffache weniger effizient als der Wildtyp, während die Glu-64-Mutante inaktiv ist. Bei pH 6 stellt dagegen die Lys-64-Mutante eine uneffektive Protonentransfergruppe dar, und Glu-64 ist nur 2-3-mal weniger effektiv als die His-64-Form (Engstrand *et al.*, 1992).

1.4 Inhibitoren der Carboanhydrase II

Bei der Entwicklung von CAII-Inhibitoren mit dem Ziel als topisch verabreichtes Medikament für das Glaukom eingesetzt zu werden, sind hohe Anforderungen an die Verbindung gestellt. Gefordert sind ein Gleichgewicht zwischen Wasser- und Fettlöslichkeit bei gleichzeitig hoher Affinität zur CAII. Einen Überblick der wichtigsten CAII-Inhibitor-Klassen wird in den anschließenden Unterkapiteln gegeben.

1.4.1 Anionen als Inhibitoren

Die Anionen z.B. HS^- , CN^- , NCO^- , N_3^- , HSO_3^- , I^- , HCOO^- sind in der Regel nur schwache Inhibitoren der CAII. Anionen die ein Proton als Bindungspartner für die OH-Gruppe von Thr-199 mitbringen (HS^- , HSO_3^-), verdrängen das Metall-gebundene Lösungsmittelmolekül ohne Änderung der tetraedrischen Bindungsgeometrie. Die Zink-Koordination bleibt über den pH-Bereich 5.7-8.0 tetraedrisch (Lindskog, 1997). HSO_3^- verdrängt das „deep water“ und bildet neben der Wasserstoffbrücke mit der Hydroxylgruppe von Thr-199, eine weitere mit der peptidischen NH-Gruppe von Thr-199 (Hakansson *et al.*, 1992).

Die meisten untersuchten Anionen ohne Wasserstoff verdrängen allerdings nicht das Zink-gebundene Wassermolekül, sie ändern geringfügig dessen Position, schwächen aber nicht die Wasserstoffbrücke zu Thr-199. Anionen, wie z.B. Nitrat binden in der Nähe des Metalls, verdrängen das „deep water“ und bilden eine Wasserstoffbrücke mit der peptidischen NH-Gruppe von Thr-199. Die Besetzung einer 5. Koordinationsstelle am Zink wird bei der Bindung von Nitrat beschrieben (Mangani & Hakansson, 1992), wobei eine verzerrt trigonal pyramidale Struktur angenommen wird.

1.4.2 Inhibierung der humanen CAII durch Inhibitoren der Sulfonamid-Klasse

Die größte und wichtigste Gruppe von CAII-Inhibitoren bilden die aromatischen bzw. heterozyklische Sulfonamidderivate. Sie inhibieren die humane CAII in der anionischen Form über einen kompetitiven Mechanismus. Die wahrscheinlich deprotonierte Sulfonamidgruppe $\text{R-SO}_2\text{-NH}^-$ bindet über den Stickstoff an das zweifach positiv geladene Zink und verdrängt dabei das im nativen Enzym gebundene Hydroxyl-Ion. Es entsteht ebenfalls ein verzerrter Tetraeder, wobei die Stickstoffatome der drei Histidinliganden (His-94, His-96, His-119) und der Stickstoff aus der Sulfonamidgruppe auf den Ecken dieses Tetraeders sitzen. Der Wasserstoff der

Sulfonamidgruppe wechselwirkt mit Thr-199 (2.81Å), während ein Sauerstoff der Sulfonamidgruppe eine Wasserstoffbrückenbindung mit der NH-Gruppe des Thr-199 eingeht. Der andere Sauerstoff der Sulfonamidgruppe verdrängt, analog HSO_3^- , das Wasser W338, das sogenannte „deep water“. Am Beispiel der Verbindungen $\text{CH}_3\text{SO}_2\text{NH}_2$ ($\text{pK}_a = 10.5$) und $\text{CF}_3\text{SO}_2\text{NH}_2$ ($\text{pK}_a = 5.8$) wird deutlich, wie entscheidend die Azidität des Inhibitors für die Bindung an die humane CAII ist. So bindet die erste Verbindung mit einer Dissoziationskonstante von 3mM (Maren & Wiley, 1968), während letztere einen Wert von 2nM (Maren & Conroy, 1993) aufweist. Aromatische bzw. heterozyklische Ringsysteme, aber auch die Trifluormethylgruppe des oben beschriebenen Inhibitors gehen mit der humanen CAII unter Einbeziehung der Seitenketten von Val-121, Phe-131, Val-143, Leu-198 und Trp-209 hydrophobe Wechselwirkungen ein (Abbildung 5).

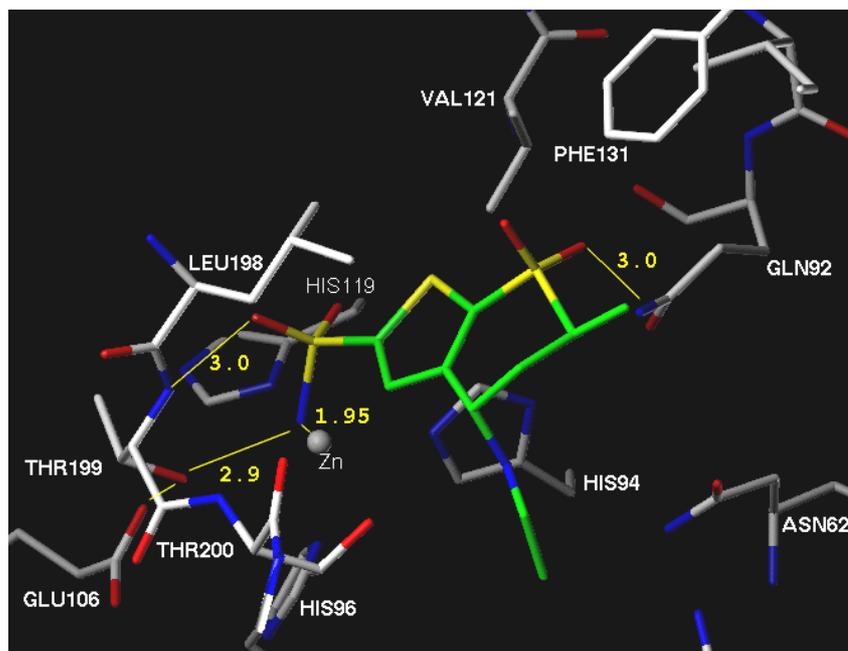


Abbildung 5 Bindungsmodus von Dorzolamid (Trusopt)(grün) in der Bindetasche der humanen CAII (Val-143 und Trp-209 nicht gezeigt).

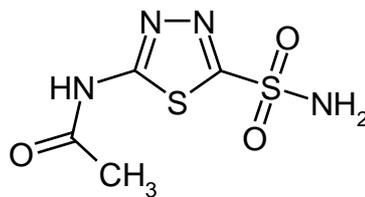
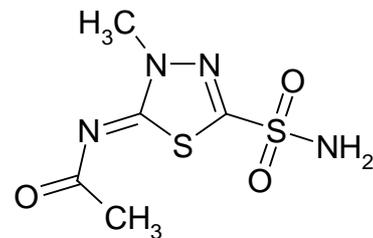
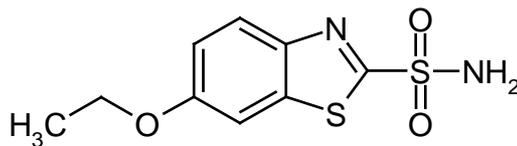
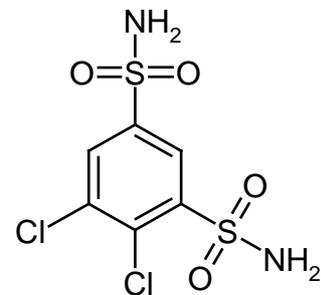
1.4.3 CAII-Inhibitoren in der Therapie

Neben der Glaukomtherapie sind eine Vielzahl an Krankheitsbildern beschrieben, bei denen sulfonamidische Inhibitoren der humanen CAII als Arzneistoffe erfolgreich eingesetzt werden. So werden zur Prävention und Behandlung der folgenden Krankheiten CAII-Inhibitoren eingesetzt: bei Epilepsie (Wilner *et al.*, 1999) (Shank *et al.*, 1994) und anderer neurologischer Erkrankungen (Brandt *et al.*, 1998), bei Zwölffingerdarm-Geschwüren (Puscas & Buzas, 1986) und Osteoporose (Kenny,

1985), bei der Höhenkrankheit (Swenson *et al.*, 1993) und selten erfolgt der Einsatz auch als Diuretika (Mutschler, 1997).

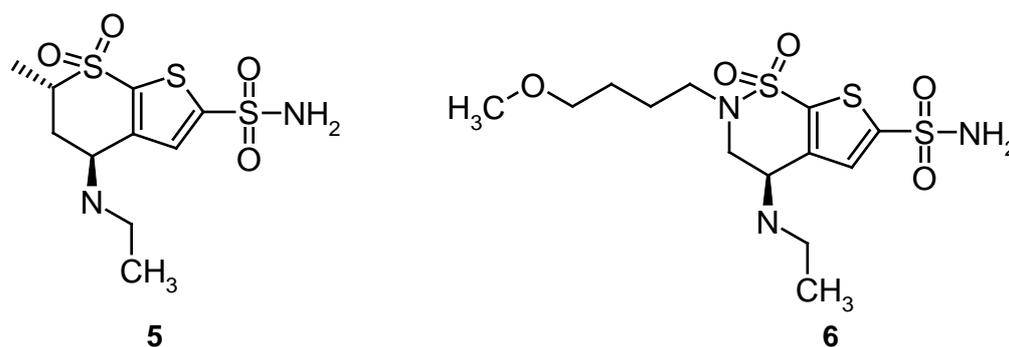
1.4.4 CAII-Inhibitoren in der Glaukomtherapie

Aufbauend auf dem beschriebenen sulfonamidischen Bindungsprinzip wurden die anschließend dargestellten Strukturen entwickelt. Diese geben einen strukturellen Überblick über die in der Glaukomtherapie systemisch eingesetzten Verbindungen. Die systemische Anwendung bedingt allerdings eine Gabe in hohen Dosen, um den intraokulären Druck durch Reduktion der Kammerwasserproduktion zu senken. Da die Wirkung der Substanzen Azetazolamid **1** (Diamox[®], Lederle, Lab., USA), Methazolamid **2** (Neptazane[®], American Home Products, USA) Ethoxolamid **3** und Dichlorphenamid **4** mit erheblichen Nebenwirkungen verbunden sind, wurden, wie bereits in Kapitel 1.2 beschrieben, weitere Inhibitoren entwickelt, die eine topische Applikation in das Auge als Lösung oder Suspension ermöglichen. Intensive Forschungsbemühungen führten zu der Klasse der Thienothiopyran-2-sulfonamide (Ponticello *et al.*, 1987), die aufgrund ihrer guten Wasserlöslichkeit gekoppelt mit einer hohen CAII-Affinität wirkungsvolle Glaukomtherapeutika darstellen. Auch die Weiterentwicklung der Azet- und Methazolamide führte zu erfolgversprechenden Derivaten (Supuran & Scozzafava, 2000).

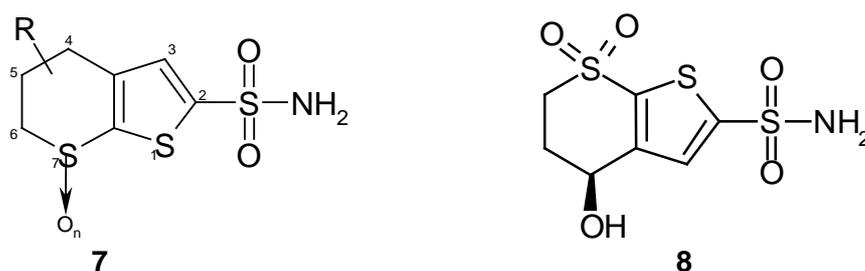
**1****2****3****4**

1.4.4.1 Thienothiopyran-2-sulfonamide

Die wichtigsten Vertreter dieser Substanzklasse stellen die Verbindungen Dorzolamid **5** (Trusopt[®], Merck, USA) (Surgue *et al.*, 1997) und Brinzolamid **6** (Azopt[®], Alcon Lab., USA) (Silver, 1998) da. Sie sind die Inhibitoren der humanen CAII, die in der Glaukomtherapie zur topischen Anwendung gelangen.

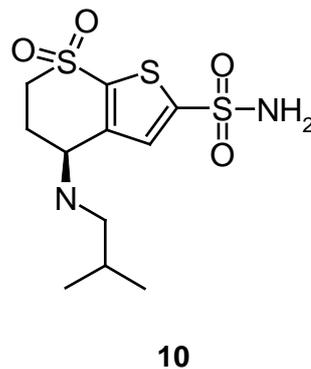
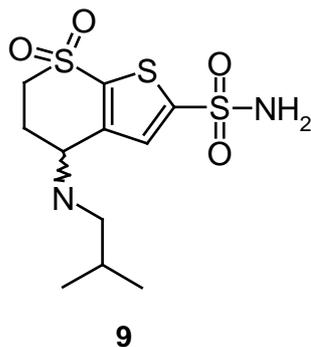


Die Entwicklung von Dorzolamid **5** ist in Literatur sehr gut dokumentiert und wird im Anschluß kurz dargestellt. Ethoxolamide **3** stellten die Ausgangsbasis für die Entwicklung von Dorzolamid **5** dar und führte zunächst zu den Thieno[2,3-b]thiopyranen **7** (Ponticello *et al.*, 1987).



Bei der Weiterentwicklung des Thienothiopyrangerüsts wurde eine idealer Kompromiß zwischen der Wasserlöslichkeit und einer hohen Affinität gesucht. Betrachtet man zunächst nur die Aktivität, so zeigen Untersuchungen, daß der Oxidationsgrad des Schwefels die Aktivität der Verbindung beeinflusst, Sulfide und Sulfoxide haben eine verminderte Aktivität gegenüber den Sulfonen. Auch der Oxidationsgrad des an C4 gebundenen Sauerstoffatoms spielt eine Rolle bei der Aktivität der Verbindungen, so besitzt das Keton eine um die Hälfte verminderte Aktivität gegenüber dem Alkohol. Die Wasserlöslichkeit dieser Verbindungen wird

beeinflusst durch das Vorliegen der OH-Gruppe bzw. dessen Position und damit die Stereochemie. Darüber hinaus ist der Oxidationsgrad des Schwefels entscheidend. So wurde letztendlich das *S*-Enantiomer **8** als „beste“ Substanz für die weiteren Untersuchungen vorgeschlagen. Interessanterweise liegt jedoch die Löslichkeit des Racemates doppelt so hoch wie die der einzelnen Enantiomere (Ponticello *et al.*, 1987). Die konsequente Weiterentwicklung von Verbindung **8** zu der Verbindung MK-927 (racemisch) **9** durch den Austausch der Hydroxylgruppe mit einer Isobutylamin-Seitenkette ergab bei Tierexperimenten am Kaninchenauge eine deutliche Minderung des IOD. Man hatte nun einen Inhibitor gefunden, der ausreichende Wasserlöslichkeit besaß, um in das Auge zu diffundieren und die CAII mit hoher Affinität ($IC_{50} = 0.6nM$) inhibiert. Affinitätstest der getrennten Enantiomere zeigten eine 100-fach stärkere Affinität des *S*-Enantiomeres MK-417 **10** als die des *R*-Enantiomeres (Baldwin *et al.*, 1989).

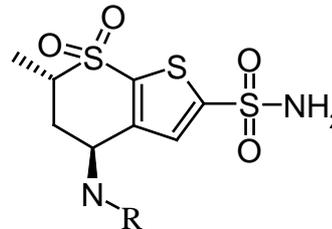


Erklären ließen sich diese Ergebnisse durch *ab initio* Rechnungen und die röntgenkristallographische Aufklärung unterschiedlicher Komplexstrukturen (Greer *et al.*, 1994) (Baldwin *et al.*, 1989). Der N-S-C-S-Diederwinkel, zwischen der sulfonamidischen Gruppe und dem Thiophenring, unterscheidet sich bei den Enantiomeren um 14°, wobei das *R*-Enantiomer eine ungünstigere Konformation einnimmt. Außerdem wird eine axiale Stellung der Isobutylamin-Seitenkette am Thiopyranring für das *S*-Enantiomere beobachtet, für das *R*-Enantiomer eine äquatoriale Stellung. Dadurch bedingt liegt der C-C-N-C-Diederwinkel der Alkylamino-Seitenkette des *S*-Enantiomers in der *trans*- und der des *R*-Enantiomers in der ungünstigeren *gauche*-Konformation vor. Eine Verschiebung des gesamten *R*-Enantiomers innerhalb der Bindetasche verbunden mit einer ungünstigen Drehung des gesamten Moleküls an der Sulfonamidgruppe, summiert sich insgesamt zu einer schlechteren Affinität (Baldwin *et al.*, 1989).

Die Entwicklung führte schließlich zu den Derivaten **11**, **12** und **5**, von denen **5** (Dorzolamid) mit der Ethylamin-Seitenkette der stärkste Inhibitor ist. Er unterliegt

einem konformerem Gleichgewicht. In der für die Inhibierung bevorzugten Konformation liegt die Ethylamino-Gruppe axial und die Methylgruppe an C6 äquatorial vor (Abbildung 6) (Smith *et al.*, 1994).

- 11:** R = H
12: R = CH₃
5: R = CH₂CH₃



Der Bindungsmodus von **11**, **12** und **5** entspricht dem in Kapitel 1.4.2 erläuterten Bindungsmodus für Sulfonamide. Der vermutlich deprotonierte sulfonamidische Stickstoff bindet an das durch die drei Histidine komplexierte Zink (1.95Å) und verdrängt das dort gebundene Wasser. Eine Wasserstoffbrücke von dem sulfonamidischen Stickstoff zu der Hydroxylgruppe von Thr-199 (2.81Å) und eine von einem der beiden sulfonamidischen Sauerstoffe zu dem NH von Thr-199 (3.0Å) fixieren den sulfonamidischen Teil der Inhibitoren. Das bicyclische Ringsystem wechselwirkt über van-der-Waals-Wechselwirkungen mit den Aminosäuren Val-121 und Leu-198. Einer der Sulfonsauerstoffatome interagiert mit der Seitenkette von Gln-92 (3.4Å), während der andere mit dem aromatischen CH von Phe-131 einen Kontakt aufweist (Abbildung 6). Die axiale Aminoethyl-Seitenkette von **5** interagiert mit Trp-5 und His-64. **5** ($K_i = 0.37\text{nM}$) ist rund fünf mal affiner als **11** ($K_i = 1.88\text{nM}$) und **12** ($K_i = 1.52\text{nM}$). Dies beruht zum einen darauf, daß der Aminoethylrest lang genug ist, His-64 in eine nach außen geklappte Position („away-Position“) zu bewegen, eine Bewegung 3Å weg vom Zink. Hierdurch werden van-der-Waals-Abstoßungen zwischen Inhibitor und Enzym vermieden. Die Reste R=H bzw. R=CH₃ von **11** und **12** sind nicht lang genug, um eine Bewegung des His-64-Restes zu verursachen. Die Struktur des Enzyms bleibt somit unverändert, und es kommt zu ungünstigeren van-der-Waals-Kontakten. Die Methylengruppe an C6 von **5** geht keine signifikanten Wechselwirkungen mit dem Protein ein.

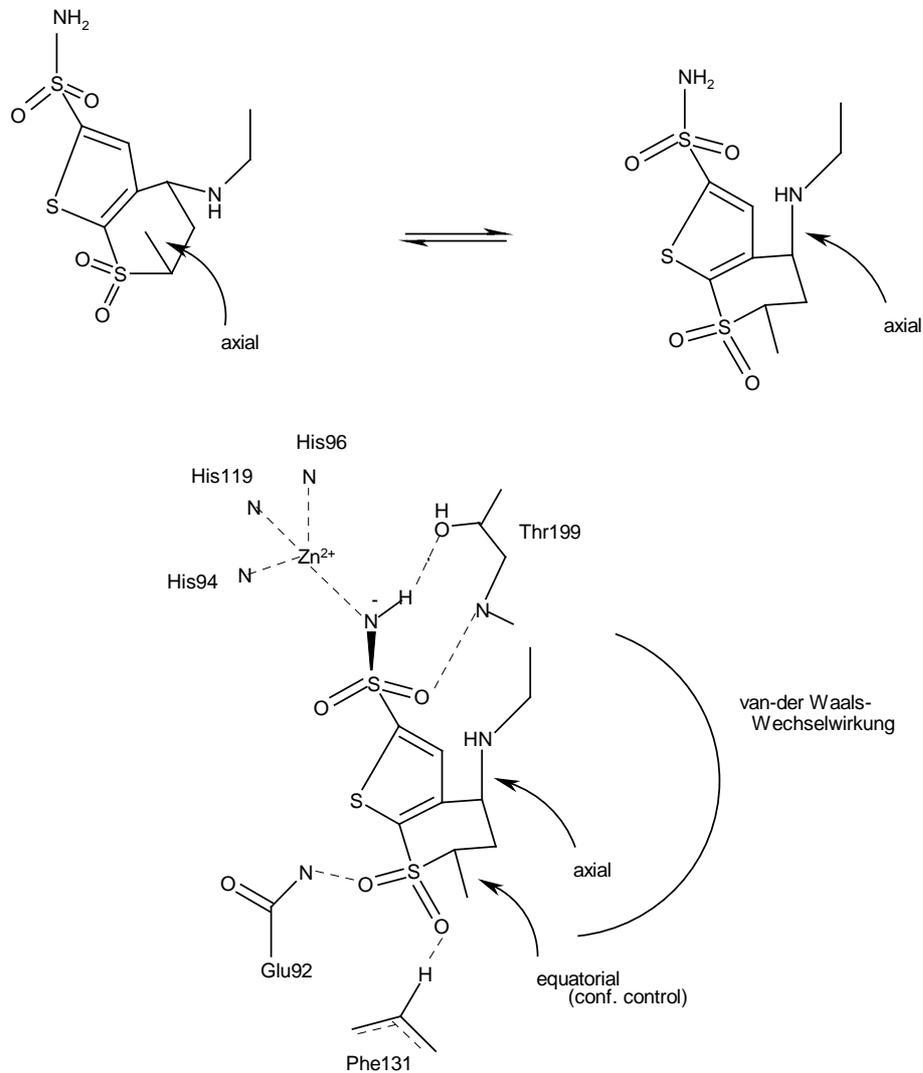


Abbildung 6 Schematische Darstellung des Bindungsmechanismus von Dorzolamid **5** im aktiven Zentrum der CAII. Von der endständigen Methylgruppe wird angenommen, dass sie als konformationsbestimmendes Element fungiert, um die axiale Stellung der Aminoethylgruppe energetisch zu begünstigen (Babine & Bender, 1997).

1.4.5 PLS-Konzept

Umfangreiche Inhibitor-Studien an *para*-substituierten Benzolsulfonamiden führten zur Entwicklung des sogenannten **PLS**-Konzeptes (Boriack *et al.*, 1995; Cappalonga *et al.*, 1994; Chin *et al.*, 1998; Gao *et al.*, 1995; Jain *et al.*, 1994a; Jain *et al.*, 1994b). Ein **PLS**-Inhibitor besteht aus **P** (**P**rimary inhibitor), dem Teil des Inhibitors, der spezifische Wechselwirkungen innerhalb der Bindetasche macht, **S** (**S**econdary ligand), dem Baustein, der am Rand des aktiven Zentrums bindet, sowie einem Brückenglied **L**

(Linker), das **P** mit **S** verbindet. Die Affinität des **PLS**-Inhibitors zur CAII ist größer als die von **P** allein. Die Untersuchungen gelten dem allgemeinen Verständnis von entropischen Beiträgen bei der Bindung von Inhibitoren und deren Einfluß auf die Bindungsaffinität, mit dem Ziel hochaffine Inhibitoren zu entwickeln.

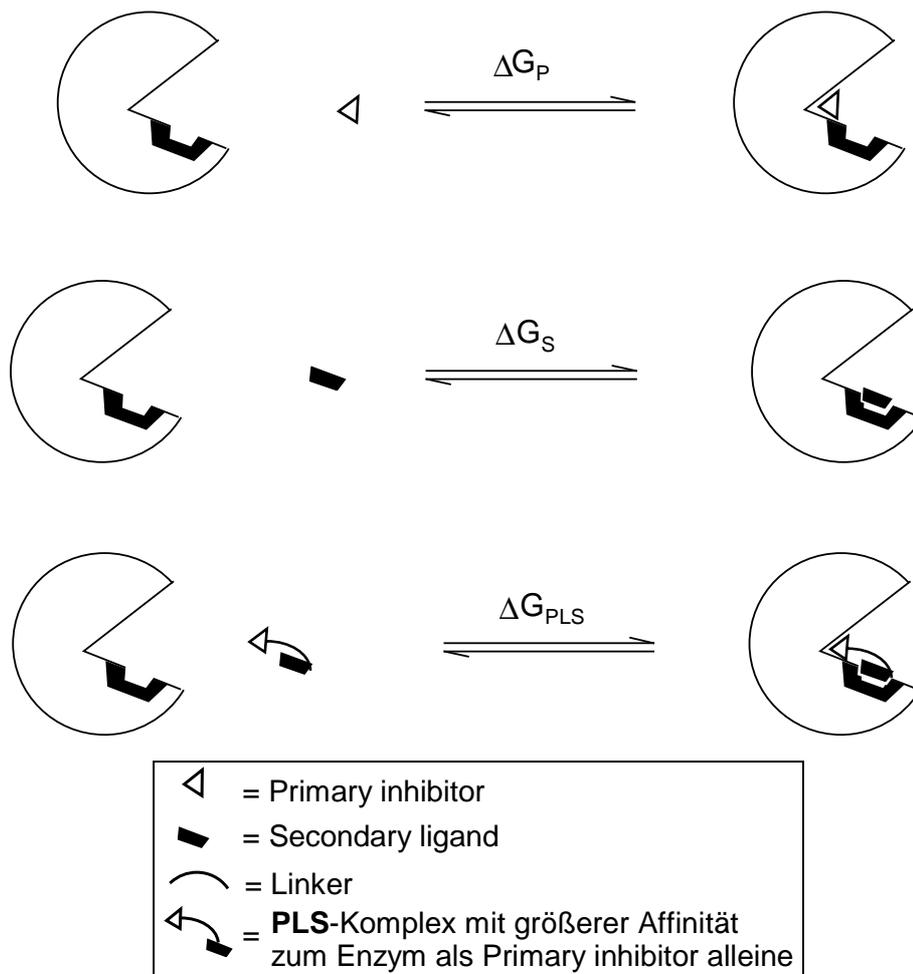


Abbildung 7 Schematische Darstellung des PLS-Konzeptes zur Verbesserung der Affinität von CAII Inhibitoren.

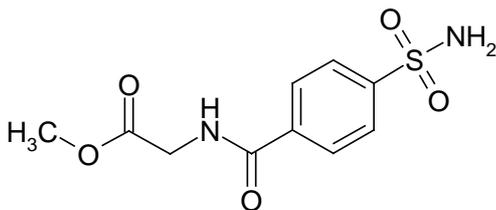
Ausgehend von einem Benzolsulfonamid als Beispiel für den spezifisch bindenden Teil **P** des Inhibitors wurden in *para*-Position als Linker **L** Oligo-Glycin- oder Oligo-1,2-Ethandiol-Einheiten benutzt (Boriack *et al.*, 1995; Jain *et al.*, 1994a). Die Kettenlänge von **L** variiert von 0 bis 6 Einheiten. Bei der Wahl der endständigen Gruppe **S** wurde ein breites Spektrum an lipophilen Gruppen untersucht. Die Erkenntnisse aus der Variation von Kettenlänge und unterschiedlichen endständigen

Gruppen ließen folgende Schlußfolgerungen zu, die grundsätzlich zu einer Erhöhung der Inhibitor-Enzym-Affinität führen sollten:

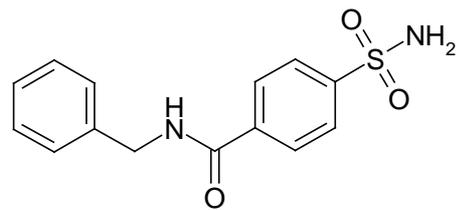
1. Eine gezielte Verbesserung mehrerer polarer Interaktionen zwischen Enzym und Inhibitor, z.B. durch Einfügen von Wasserstoffbrücken-Donatoren/-Akzeptoren.
2. Den Entropieanteil bei der Ligandenbindung möglichst günstig gestalten z.B. durch Einfrieren bzw. Fixieren der Protein gebundenen Konformation durch Einbau von Aminosäuren mit geringerer Flexibilität als Glycin.
3. Jeder zusätzliche konformative Freiheitsgrad (Rotation bzw. Translation) bedingt durch eine Vergrößerung der Moleküle sollte mit einer Vergrößerung der Enzym-Inhibitor-Kontaktfläche einhergehen.

Bei der Analyse der Kristallstruktur der CAII wurden zwei Bereiche identifiziert, die für hydrophobe Wechselwirkungen in Frage kommen. Phe-131 mit 52\AA^2 Lösungsmittel-zugänglicher Oberfläche liegt 12\AA entfernt von dem Boden der Tasche am Rand des aktiven Zentrums. Leu-198/Pro-201/Pro-202 mit insgesamt 113\AA^2 Lösungsmittel-zugänglicher Oberfläche liegen am Rand der Bindetasche, dieser Bereich ist jedoch meist durch Wassermoleküle abgeschirmt.

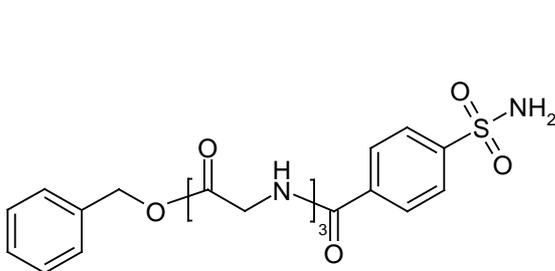
Am folgenden Beispiel von Cappalunga *et al.* (Cappalunga *et al.*, 1994) und Jain *et al.* (Jain *et al.*, 1994b) wurde der Bindungsbeitrag der Kettenlänge und der endständigen Gruppe untersucht. Die Verbindungen, die hierzu benutzt wurden, waren N-(4-sulfamylbenzoyl)glycinmethylester (**SBG**) **14**, N-(4-sulfamylbenzoyl)benzylamin (**SBB**) **15**, N-[N-[N-(4-sulfamylbenzoyl)glycyl]glycyl]glycinbenzylester (**SBG₃**) **16** und N-[N-[N-(4-sulfamylbenzoyl)phenylglycyl]glycyl]glycinbenzylester **17**.



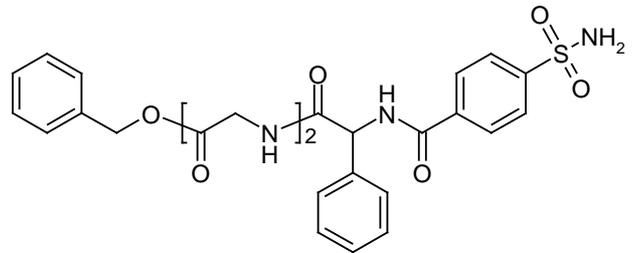
14: $K_D = 63\text{nM}$



15: $K_D = 1.1\text{nM}$



16: $K_D = 75\text{nM}$



17: $K_D = 0.9\text{nM}$

Die Kristallstrukturanalyse der Komplexe zeigt, daß der Bindungsmodus in dem aktiven Zentrum weitgehend dem der Thienothiopyran-2-sulfonamiden entspricht. Die in *para*-Position zur Sulfonamidgruppe eingeführten hydrophoben Oligopeptidylreste wechselwirken unspezifisch mit den hydrophoben Aminosäureresten Leu-198, Pro-201 und Pro-202. Der Oligopeptidylrest ist mit dem hydrophoben Bereich des aktiven Zentrums assoziiert und erhöht somit die Bindungsaffinität des Inhibitors zur CAII. Da keine Wasserstoffbrücken vorliegen, wird die Minimierung der Lösungsmittelzugänglichen Oberfläche des Inhibitors und des Enzyms (Desolvatisierung) verbunden mit hydrophoben van-der-Waals-Wechselwirkungen als Grund für die hohe Affinität angenommen. Aus den K_D -Werten erkennt man, daß **15** stärker an CAII bindet als **14**. Strukturell betrachtet, besitzen beide Verbindungen annähernd dieselbe Anzahl an konformativer Freiheitsgraden, die bei einer Assoziation mit dem Enzym „eingefroren“ werden müssen. Die Kontaktfläche von **15** ist jedoch, bedingt durch die Benzylaminokette, ca. 10% größer als die von **14**, so daß entsprechend Punkt 3 (siehe oben) eine Maximierung der Kontaktfläche pro Freiheitsgrad vorliegt. Dieser Effekt hat vermutlich eine Erhöhung der Affinität zur Folge.

Unerwarteter Weise zeigt die Länge der Kette keine große Wirkung bei der Steigerung der Bindungsaffinitäten (Jain *et al.*, 1994a). Aus kristallographischen Untersuchungen der Komplexe geht hervor, daß für die Affinität der Teil der Inhibitorstruktur entscheidend ist, der sich direkt an den Benzoylsulfonamidischen Teil anschließt. Vergleicht man **16** und **17**, so zeigt sich, daß die Hinzunahme eines Phenylringes im Zentrum des Moleküls **17** durch Wechselwirkungen mit Pro-202 und Phe-131 die Bindungsaffinität deutlich erhöht, während der Rest der Kette sich entlang der „hydrophoben Wand“ faltet und u.a. mit Leu-198 und Pro-201 wechselwirkt. Diese Wechselwirkungen, so wird angenommen, müssen einen günstigen enthalpischen Beitrag ΔH liefern, der jedoch durch einen ungünstigen entropischen Beitrag $T\Delta S$ kompensiert wird (Cappalonga *et al.*, 1994; Jain *et al.*, 1994a) und somit insgesamt keinen positiven Beitrag zur Bindungsaffinität leistet.

1.4.6 Hydroxamate

Neben der etablierten „Sulfonamidischen Ankergruppe“ am Zink der CAII wurde vor kurzem die bereits bei anderen zinkhaltigen Enzymen erfolgreich als Zinkanker eingesetzte Hydroxamat-Gruppe im Komplex mit der CAII strukturell charakterisiert (Scolnick *et al.*, 1997). Der bisher beschriebene Bindungsmodus in Metalloproteasen (Grams *et al.*, 1995) geht für diese Gruppe von einer fünffach-koordinierten Chelatisierung des Zinks durch den Carbonyl- und den Hydroxylsauerstoff des Hydroxamtes aus.

Ein neuer Bindungsmodus wird für Acetohydroxamsäure ($IC_{50} = 47\mu M$) (PDB-Code: 1AM6) und für Trifluoracetohydroxamsäure ($IC_{50} = 3.8\mu M$) als Liganden in der Kristallstruktur der humanen CAII beobachtet (Abbildung 8) (Scolnick *et al.*, 1997). Auch hierbei ist, wie bei den Sulfonamiden, vermutlich ein deprotonierter Stickstoff für die Bindung an das Zink verantwortlich. Ebenfalls wird das „deep water“ verdrängt und über die Hydroxylgruppe des Liganden eine Wasserstoffbrückenbindung zu dem Hydroxylsauerstoff von Thr-199 gebildet. Eine weitere schwache Wasserstoffbrückenbindung wird zwischen dem Carbonylsauerstoff des Hydroxamates und der NH-Gruppe von Thr-199 angenommen (3.4\AA). Dieses Wasserstoffbrückennetzwerk kann nur ausgebildet werden, wenn der für Hydroxamate wie in vielen anderen Metalloproteasen beobachtete Bindungsmodus hier nicht vorliegt. Bei der Trifluoracetohydroxamsäure wechselwirken zusätzlich die drei Fluoratome mit den hydrophoben Resten der Bindetasche (Val-121, Val-140, Val-143, Leu-198, Trp-209) und gleichzeitig wird die fünfte Position am Zink wahrscheinlich durch eines der Fluoratome besetzt.

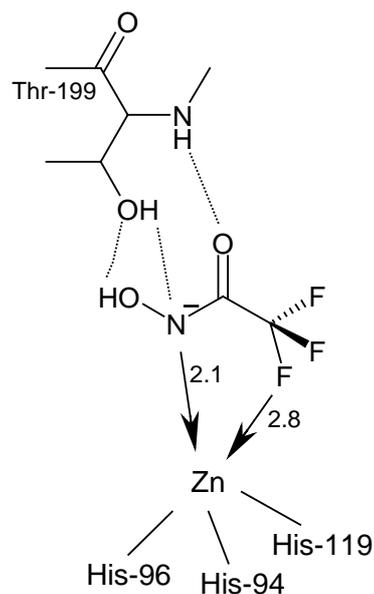


Abbildung 8 Schematische Darstellung des Bindungsmodus von Trifluorhydroxamat.

Unter Einbeziehung der His-94, His-96, His-119 wird eine trigonal bipyramidale Geometrie für die Trifluoracetohydroxamsäure um das Metallion angenommen. Obwohl für die Acetohydroxamsäure diese zusätzliche Wechselwirkung mit dem Zinkatom nicht möglich ist, wird dennoch ein analoger Bindungsmodus der Hydroxamatgruppe in der Kristallstruktur gefunden (Scolnick *et al.*, 1997).

1.5 Rationales Wirkstoffdesign

1.5.1 Allgemeine Erkenntnisse

Ein wesentlicher Schritt bei der rationalen Entwicklung eines Wirkstoffes ist es frühzeitig zu erkennen, ob eine Verbindung die Eigenschaften besitzt, die für die Wirkung am Wirkort notwendig sind. Bei einer oralen Applikation sollten dementsprechend Magen, Darm und Leber erfolgreich passiert werden (Clark & Pickett, 2000).

Ein Datensatz, zusammengesetzt aus 2245 Verbindungen des WDI (World Drug Index) diente Lipinski *et al.* (Lipinski *et al.*, 1997) als Grundlage zur Ableitung der folgenden Regeln („Rule of 5“). Diese Regeln sollen der Abschätzung dienen, ob eine Verbindung den Anforderungen an Absorption und Permeabilität in der Zelle genügt. Als unwahrscheinlich wird eine Absorption und Permeabilität zum Überwinden von lipophilen Membranen angesehen, wenn folgende vier Bedingungen zu treffen:

1. Es sind mehr als 5 H-Brückendonatoren (bestehend aus OH- und NH-Gruppen) vorhanden.
2. Das Molekulgewicht liegt oberhalb von 500D.
3. Der logP ist größer als 5 (berechneter MlogP (Moriguchi) über 4.15)
4. Es sind mehr als 10 H-Brückenakzeptoren (Anzahl der N- und O-Atome) im Molekül vorhanden.

Lipinski schlägt vor, für den Fall, daß zwei der Kriterien erfüllt sind, die Verfügbarkeit nicht mehr gewährleistet ist. Anhand dieser Regeln können nun Datenbanken gefiltert werden, um die Verbindungen, die möglicher Weise eine verminderte Absorption haben, von Beginn an auszuschließen.

Der bei diesen Regeln verwendete Ausdruck logP (Partition coefficient, Verteilungskoeffizient) ist eine Koeffizient, der die Verteilung einer Verbindung zwischen einer hydrophoben Flüssigkeit (Octanol) und einer hydrophilen Flüssigkeit (Wasser) beschreibt. $\text{LogP (Octanol/Wasser)}^a$, der die hydrophoben Eigenschaften eines Moleküls beschreibt, die bei der Bindung an ein Protein eine Rolle spielen, ist aber ebenfalls gleichsinnig korreliert mit der Wasserlöslichkeit und der Permeabilität eines Moleküls. Für die Berechnung dieser Koeffizienten wurden eine Vielzahl an Programmen entwickelt. Ein guter Methodenüberblick wird von A.J. Leo (Leo, 1993)

^a Ein $\text{LogP}_{\text{Octanol}}$ von 5 entspricht einer sehr hydrophoben Substanz, ein $\text{LogP}_{\text{Octanol}}$ von -5 einer vergleichsweise sehr hydrophilen Substanz.

gegeben. In dieser Arbeit wurden die angegebenen logP-Werte mit dem Programm MlogP (Moriguchi *et al.*, 1994; Moriguchi *et al.*, 1992) berechnet.

Ziel der Arbeit ist das sukzessive Durchsuchen von Datenbanken. Um eine Kontrolle über den Erfolg und die Aussagekraft der Suchkriterien zu behalten, läßt man üblicher Weise einige bekannte Testverbindungen bei der Suche „mitlaufen“ und überprüft, ob sie die Filterkriterien passieren und unter den ersten, als „beste Treffer“ gefunden werden. Um diese Erfolgsrate zu quantifizieren, führt man Anreicherungsraten ein.

Um den Erfolg eines Suchverfahrens zu bewerten, das eine Reihung der selektierten Verbindungen vornimmt (siehe nächstes Kapitel), aber auch um mehrere Suchverfahren untereinander zu vergleichen, wurde von Briem und Kuntz (Briem & Kuntz, 1996) ein Anreicherungsfaktor $E(p)$ („Enrichmentfactor“) eingeführt (Gleichung 1).

Gleichung 1

$$E(p) = \frac{\binom{H_a}{H}}{\binom{C_a - 1}{C - 1}}$$

Die Idee hierbei ist, Verbindungen C_a , deren Aktivitäten für das Zielprotein bekannt sind, in die Datenbanksuche miteinzubeziehen. Für ein gewissen Prozentsatz p an Treffern H wird die Anzahl an aktiven Verbindungen H_a , die sich unter diesen befinden, ermittelt (Gleichung 1). Der angegebene Wert gibt dann die Anreicherungsrate an, ein Wert von 1 entspricht keiner Anreicherung. C ist die Gesamtzahl an Verbindungen in der Datenbank.

1.5.2 2D-Überlagerung- und Suchverfahren

In einer Datenbank sind Moleküle so abgelegt, daß ihre Topologie und ihre Eigenschaften in einer Rechner-lesbaren Form vorliegen und so gezielte Suchen nach der Zusammensetzung (Aufbau) und deren Eigenschaften möglich sind. 2D-Ähnlichkeits/Topologie-Suchverfahren sind in der Lage, Moleküle wechselseitig aufgrund der in den Datenbanken verwendeten strukturellen Kodierung zu vergleichen. Einer der gebräuchlichsten Ansätze, um ein 2D-Strukturdiagramm eines Moleküles in einer Datenbank abzubilden, ist die sogenannte Konnektivitätstabelle („connection table“) (Downs & Willett, 1996). Ein entscheidendes Charakteristikum einer solchen Darstellung ist die Möglichkeit der mathematischen Umsetzung. Der Vorteil einer solchen Umsetzung ist, daß Algorithmen, die ursprünglich für die Überprüfung von Isomorphismen von Graphen entwickelt worden sind, nun zur Datenbanksuche

eingesetzt werden können. So wird bei einer Molekülsuche in einer Datenbank abgefragt, ob ein Molekül in dieser Datenbank vorhanden ist oder nicht. Bei der Substruktursuche wird nach solchen Molekülen gesucht, bei denen Teile (Substrukturen^a) übereinstimmen. Die Substruktursuchen sind der Schwerpunkt bei der Entwicklung von chemischen Informationssystemen (Downs & Willett, 1996).

Um die topologische Ähnlichkeit zweier Moleküle zu vergleichen, dienen häufig Binärziffern-Zeichenketten von Fragmenten oder Substrukturen („fragment bit-maps“)^b, auch als *fingerprint* bezeichnet. Hierbei steht jedes Zeichen einer Binärziffern-Zeichenkette für das Vorhandensein oder Fehlen einer Substruktur in einem Molekül. Die Annahme besteht nun darin, daß ähnliche Moleküle einen ähnlichen *fingerprint*, also ähnliche Substrukturen besitzen. Die 2D-Ähnlichkeit zweier Moleküle kann mit Hilfe des Tanimoto-Koeffizienten T_C (Gleichung 2) (Dean, 1995; Downs & Willett, 1996) anhand dieser *fingerprints* berechnet werden.

$$\text{Gleichung 2} \quad T_C = C / (A+B) - C$$

T_C = Tanimotokoeffizient

C = Anzahl an der Binärzeichen die in beiden Fingerabdrücken festgesetzt sind

B = Anzahl an Binärzeichen in Fingerabdruck #2

A = Anzahl an Binärzeichen in Fingerabdruck #1

Der erhaltene T_C -Wert (Tanimoto-Koeffizient) variiert je nach topologischer Ähnlichkeit der Moleküle zwischen 1 für identische Moleküle bis hin zu 0 für völlig im Rahmen der zugrundeliegenden Metrik (Menge der gewählten Fingerprints) verschiedener Moleküle.

Die Berechnung der 2D-Ähnlichkeit von Molekülen wird u.a. eingesetzt, um Datenbanken zu gruppieren („clustern“) (Hansch *et al.*, 1973). Hierunter versteht man, daß z.B. in ihrer biologischen Aktivität ähnliche Moleküle innerhalb einer Datenbank in kleinen Untergruppen zusammengefaßt werden, die dann nur noch von einem charakteristischen Vertreter, dem Archetyp, repräsentiert werden. So findet also eine Reduzierung der Molekülzahl statt, ohne einen wesentlichen Verlust an Vielfalt im Hinblick auf die Zielfunktion in Kauf zunehmen. Dies erfolgt mit dem Ziel, bei computergestützten Suchen in großen Datenbanken Zeit zu sparen und das Auftreten von redundanten Informationen zu vermeiden. Es stellt sich aber die Problematik einen

^a Substrukturen, auch Teilstrukturen oder Partialstrukturen genannt, können z.B. gemeinsame Strukturmerkmale von Verbindungsklassen sein.

^b auch „fragment bit-strings“ genannt

„Radius“ zu definieren, innerhalb dessen man noch von „ähnlichen“ Molekülen bzw. „diversen“ Molekülen, im Sinne der gleichen biologischen Aktivität sprechen kann. Als Radius versteht man hier häufig den Tanimoto-Koeffizienten, der einen fließenden Übergang von „ähnlichem“ bis hin zum „unähnlichem“ Molekül in einer Maßzahl zu quantifizieren versucht. Ferguson *et al.* (Ferguson *et al.*, 1996) und Taylor (Taylor, 1995) sprechen von einem Tanimoto-Koeffizienten von 0.8 bis 0.85, der bei der Berechnung von *fingerprints* als Grenze zum Zusammenfassen von Molekülen in einem „Cluster“ anzusehen ist.

1.5.3 3D-Überlagerungs- und Suchverfahren

Die Anwendungsgebiete von dreidimensionalen Überlagerungsverfahren^a reichen von der 3D-Suche in Datenbanken („database screening“), über das Berechnen molekularer Ähnlichkeiten^b („molecular similarity“) und der Ableitung eines Pharmakophors^c bis hin zur eigentlichen Überlagerung kleiner Moleküle („superpositioning“, „alignment“). Die Motivation, die zur Entwicklung und Anwendung dieser Verfahren führt, ist die mangelnde Kenntnis der Rezeptorstruktur und der Wunsch dennoch Vorhersagen über Bindungsaffinitäten neuer Verbindungen zu treffen. Aufgrund der Vielzahl an Verfahren wird an dieser Stelle nur ein kurzer Abriss neuerer Verfahren gegeben. Ein Verfahren, das die Überlagerung von Proteinen ermöglicht, ist in Kapitel 2.6.1 beschrieben. Ein umfassender Überblick über die meisten der gängigen Verfahren wird von Lemmen *et al.* (Lemmen & Lengauer, 2000), von Dean *et al.* (Dean, 1995) und in den Standardwerken herausgegeben von Kubinyi *et al.* (Kubinyi, 1993; Kubinyi *et al.*, 1998) gegeben. In Kapitel 4 werden die in dieser Arbeit angewandten Methoden im Detail besprochen.

3D-Superpositionierungsverfahren können bei nicht vorhandener Rezeptorstruktur eine räumliche Überlagerung von Liganden entsprechend ihrer angenommenen bioaktiven Konformation in einer fiktiven Bindetasche generieren. Diese Art der Überlagerung wird bei 3D-QSAR-Verfahren (Greco *et al.*, 1998) (Quantitative Structure-Activity Relationships) als Voraussetzung benötigt, um innerhalb einer Serie von Inhibitoren Modelle aufzustellen, die den Zusammenhang zwischen Molekülstrukturen und biologischen Daten in Hinblick auf eine Bindung an einen möglichen Rezeptor herstellen. Diese Modelle erklären dann im Idealfall die

^a Überlagerungsverfahren werden auch als Super(im)positionierungs- (*engl.* superimpose, überlagern) oder Alignment-Verfahren (*engl.* align, ausrichten) bezeichnet.

^b Molekulare Ähnlichkeit beinhaltet im allgemeinen: Bindungsmuster, Atomposition, Konformation, Gestalt (Volumen; Oberfläche) und die räumliche Verteilung von physiko-chemischen Eigenschaften eines Moleküls.

^c Molekülbestandteile (funktionelle Gruppen) eines Wirkstoffes, die mit dem entsprechenden Rezeptor wechselwirken, werden als *Pharmakophor* dieser Verbindung bezeichnet.

beobachteten Bindungsaffinitäten der Liganden und können darüber hinaus die biologischen Affinitäten unbekannter, jedoch strukturell ähnlicher Moleküle vorhersagen. Programme, mit denen ein solches Alignment von Molekülen erzielt wird, setzen in der Regel entweder die Vorgabe eines Referenzmoleküls oder eines spezifischen Pharmakophors voraus. Weiterhin wird bei der Verwendung solcher Alignmentverfahren davon ausgegangen, daß die zu überlagernden Moleküle an derselben Stelle eines rigiden Rezeptors binden und dementsprechend dieselben funktionellen Gruppen des Rezeptors beanspruchen.

Das Programm DISCO (**DIS**tance **CO**mparisons) (Brint & Willett, 1989; Martin *et al.*, 1993) kann, ausgehend von einem Datensatz aktiver Moleküle, einen Pharmakophor bestimmen, der wiederum als Ausgangspunkt für anschließende Datenbanksuchen dient oder zur Überlagerung von Molekülen genutzt werden kann. Über eine Konformationsanalyse werden zunächst eine Serie aktiver Konformationen für jede Verbindung des Datensatzes erzeugt. Im Anschluß daran werden alle möglichen funktionellen Gruppen der Moleküle, die den Pharmakophor bilden könnten (z.B. Eigenschaften wie Wasserstoffbrücken, hydrophobe Bereiche) miteinander korreliert. Eine Referenzverbindung mit möglichst wenigen Konformationen und möglichst allen erforderlichen funktionellen Gruppen dient hierbei als Vergleich für das Auffinden eines gemeinsamen Pharmakophormusters. Um einen Satz an pharmakophorbildender Punkte zu bestimmen, der in mindestens einer Konformation jeder Verbindung realisiert wird, erfolgt ein Abstandsvergleich der pharmakophoren Gruppen der Referenzkonformationen mit allen erzeugten Konformationen des restlichen Datensatzes. Ein spezieller Algorithmus („clique detection“) ermittelt dabei den größten Satz („cliques“) gemeinsamer Abstände innerhalb einer vorgegebenen Toleranz.

Entscheidend für die Überlagerung von Molekülen ist weniger eine Ähnlichkeit in dem Pharmakophor bildenden Molekülgerüst sondern vielmehr eine Ähnlichkeit in den auf den Rezeptor gerichteten molekularen Erkennungseigenschaften. Eine realistischere Überlagerung von Molekülen wird daher durch die Berücksichtigung der für die Bindung essentiellen physiko-chemischen Eigenschaften eines Liganden im Raum erreicht. Ein Alignment wird sodann anhand der den Molekülen zugeordneten Wechselwirkungsfeldern realisiert. Die *Field-Fit-Methode* (Clark *et al.*, 1990) verwendet zur Überlagerung sterische und elektrostatische Felder, die durch Feldberechnungen an Gitterpunkten außerhalb der van-der-Waals-Oberfläche zustande kommen. Dabei werden die Unterschiede zwischen einem ortsfesten Referenzfeld und dem Feld der durch Translations- und Rotationsbewegungen zu überlagernden

Verbindung minimiert. In der Regel existieren sehr viele lokale Minima für diese Bedingung; die Methode ist daher stark von der gewählten Startorientierung abhängig.

Der von R. Carbó (Carbó *et al.*, 1980) entwickelte Ansatz zur Bestimmung der Ähnlichkeit zweier Moleküle begründet sich auf dem Vergleich der ihnen zugeordneten Felder bzw. Eigenschaftsverteilungen (ursprünglich Elektronendichten). Der Carbó-Ansatz verwendet den Betrag der Differenz der Elektronendichteverteilungen ρ_A und ρ_B als ein Maß für die Ähnlichkeit zweier Molekülstrukturen:

Gleichung 3

$$\epsilon_{AB} = \int |\rho_A - \rho_B|^2 d\tau = \int \rho_A^2 d\tau + \int \rho_B^2 d\tau - 2 \int \rho_A \rho_B d\tau$$

Je kleiner ϵ_{AB} ist, desto ähnlicher sind sich die Moleküle. Bei der Überlagerung rigider Moleküle durch Minimieren von ϵ_{AB} ist nur der dritte Term von der relativen Position der beiden Moleküle abhängig. Anstatt ϵ_{AB} zu minimieren, kann das Überlappungsintegral

Gleichung 4

$$\int \rho_A \rho_B d\tau$$

maximiert werden. Ein von der chemischen Natur der Moleküle (insbesondere von der Molekülgröße) unabhängiges Ähnlichkeitsmaß ist der normierte Carbó-Index, der Werte zwischen 0 und 1 annehmen kann.

Gleichung 5

$$r_{AB} = \frac{\int \rho_A \rho_B d\tau}{\left(\int \rho_A^2 d\tau \int \rho_B^2 d\tau \right)^{1/2}}$$

Im Gegensatz zum Carbó-Index, der vor allem die Ähnlichkeit der Molekülform mißt, spricht der Hodgkin-Index (Hodgkin & Richards, 1987) besser auf numerische Größenunterschiede an.

Gleichung 6

$$H_{AB} = \frac{2 \int \rho_A \rho_B d\tau}{\int \rho_A^2 d\tau + \int \rho_B^2 d\tau}$$

Das Programm SEAL (**S**teric and **E**lectrostatic **A**lignment) (Kearsley & Smith, 1990) wurde ursprünglich von Kearsley und Smith entwickelt und versucht, ähnlich zu der *Field-Fit*-Methode, Moleküle anhand ihrer sterischen und elektrostatischen Eigenschaften zu überlagern. Diese werden über ein Maß für die Atomgröße bzw. Partiaalladungen, approximiert und durch an den Atompositionen verankerten *Gauss*-Funktionen ausgedrückt. Das Ähnlichkeitsmaß zweier rigider Moleküle bei der Überlagerung wird durch eine Bewertungsfunktion ermittelt, die formale Ähnlichkeit zum Carbó-Ansatz aufweist. Der räumliche Verlauf der zugewiesenen Eigenschaften wird bei der Berechnung der Bewertungsfunktion über *Gauss*-Funktionen dargestellt. Die Überlagerung erfolgt dadurch, daß die Bewertungsfunktion durch Translation und Rotation eines Moleküls maximiert wird. Der ursprüngliche SEAL-Ansatz wurde von Klebe *et al.* (Klebe *et al.*, 1994) modifiziert, indem die physiko-chemischen Eigenschaften um atombasierende Hydrophobizitäten und Wasserstoffbrückeneigenschaften erweitert wurden. Die Parameter der Bewertungsfunktion wurden anhand experimenteller Daten kalibriert.

Sechs Freiheitsgrade müssen gleichzeitig bei der Optimierung der Ähnlichkeitsfunktionen berücksichtigt werden: jeweils drei für die Translation und drei für die Rotation eines Moleküls. Die Programme QUASIMODI (Nissink *et al.*, 1997) und RIGFIT (Lemmen *et al.*, 1998a) beschleunigen diese rechenintensive Optimierung durch Transformation der Eigenschaftsfunktionen in den Fourier-Raum. In QUASIMODI wird die durch Slaterfunktionen beschriebene Elektronendichte verwendet. RIGFIT (Kapitel 2.3.2) nutzt sterische, elektrostatische, hydrophobe und Wasserstoffbrückeneigenschaften, die durch atombasierte *Gauss*-Funktionen dargestellt werden. Das Ähnlichkeitsmaß wird über den Hodgkin-Index ermittelt. Durch Transformation der Funktionen in den Fourier-Raum lassen sich die Translation und Rotation getrennt voroptimieren, was zu der gewünschten Beschleunigung führt. In einem letzten Schritt muß dann noch im 6-dimensionalen Raum optimiert werden. Dieser Optimierungsschritt konvergiert allerdings sehr schnell, da bereits zuvor eine Lösung sehr nahe dem Optimum gefunden wurde.

Die Flexibilität von Molekülen wurde bei den bisher besprochenen Verfahren nur indirekt durch die Betrachtung mehrerer diskreter Konformationen bei der Analyse berücksichtigt. Das Programm FLEXS (Lemmen & Lengauer, 1997; Lemmen *et al.*, 1998b) (Kapitel 2.3.2) erlaubt eine explizite flexible Überlagerung zweier Moleküle. Ausgehend von einem starren Referenzliganden, der möglichst in der biologisch aktiven Konformation vorliegt, wird ein Testligand flexibel superpositioniert.

Ebenfalls eine flexible Überlagerung der Moleküle ist mit dem Programm GASP (**G**enetic **A**lgorithm **S**imilarity **P**rogram) (Jones *et al.*, 1995a) unter Verwendung eines

genetischen Algorithmus (Goldberg, 1989; Judson, 1997) möglich. Informationen, die von GASP zum Alignment verwendet werden, sind Torsionswinkel aller drehbaren Bindungen im Molekül und die räumliche Anordnung funktioneller Gruppen wie Wasserstoffbrückendonatoren bzw. -akzeptoren und Ringzentren. Ein gewähltes *Basismolekül* dient als Referenzverbindung zur flexiblen Überlagerung der Moleküle des Datensatzes. Gleichzeitig wird eine sogenannte *fitness function* mit dem Ziel einer maximalen Überlagerung strukturell gleichartiger Eigenschaften optimiert. Diese Funktion bewertet Kriterien wie Anzahl und Grad der Ähnlichkeit überlagerter Gruppen, Überlappungsvolumina und van-der-Waals-Energien der jeweiligen Molekülkonformationen. Der Nachteil dieser Methode gegenüber der vorherigen Methode ist die benötigte Rechenzeit. Bei FLEXS wird innerhalb von Minuten eine flexible Überlagerung zwischen zwei Molekülen durchgeführt, GASP hingegen braucht bis zu einer Stunde auf einem vergleichbaren Rechner für sieben Moleküle (Lemmen & Lengauer, 2000).

1.5.4 Docking-Verfahren

Das automatische Einpassen von Liganden in eine räumlich definierte Bindetasche eines Proteins wird als „Docking“ bezeichnet. Docking-Verfahren kombinieren die Vorhersage möglicher Bindungsmodi von Protein-Ligand-Komplexen mit der Vorhersage von Affinitäten dieser geometrischer Anordnung. Eine gute Übersicht der bisher entwickelten Computer-Algorithmen und Programme wird von Oprea & Marshall, Bamborough & Cohen, Lengauer & Rarey und Rosenfeld *et al.* (Bamborough & Cohen, 1996; Lengauer & Rarey, 1996; Oprea & Marshall, 1998; Rosenfeld *et al.*, 1995) gegeben.

Eines der ersten Programme dieser Art war DOCK, das in seiner ursprünglichen Version Liganden mit einer festgelegten Konformation aus einer Datenbank entnimmt und sie mit Hilfe eines Distanzgeometrie-Verfahrens aufgrund sterischer Komplementaritäten in der rigiden Proteinbindetasche plaziert. Dazu wird die Bindetasche mit einem Satz von Kugeln variabler Radien gefüllt. Voraussetzung ist, daß die Sphären mindestens zwei Kontaktpunkte mit der Connolly-Oberfläche (Connolly, 1983) der Tasche aufweisen. Die so definierten Kugelzentren ergeben dann potentielle Positionen für Ligandatome. Dieser Ansatz wurde später durch ein Kraftfeld erweitert, das zusätzlich elektrostatische Wechselwirkungen berücksichtigt (Meng *et al.*, 1993). Die Flexibilität der Liganden wird in der aktuellen Version (DOCK 4.0) durch zwei alternative Methoden realisiert. Der erste Ansatz erzeugt zunächst eine bestimmte Anzahl an Konformationen für einen Liganden, die dann jeweils rigide in die Bindetasche eingepaßt werden (Wang *et al.*, 1999). Der zweite Ansatz beruht auf

einem inkrementellen Aufbau des Liganden in der Bindetasche (Makino & Kuntz, 1997). Hierbei wird zunächst ein ausgewähltes Ankerfragment plaziert und geometrisch optimiert. Ist das gesamte Molekül in der Bindetasche aufgebaut, wird mit einer flexiblen *Simplex*-Minimierung die Ligandkonformation optimiert. Die Bewertung des Ligand-Protein-Komplexes kann bei DOCK durch drei verschiedene Methoden berechnet werden; zum einen durch die Abschätzung der sterischer Komplementarität (*contact score*), dann durch eine auf dem AMBER-Kraftfeld (Weiner & Kollman, 1981) beruhende Bewertung (*energy score*), sowie durch einen auf der Modifikation der van-der-Waals-Energie basierenden Ansatz (*chemical score*). Die Zeit, die DOCK zum flexiblen „Docken“ eines Liganden benötigt, liegt bei ca. 1-3 Minuten (Makino & Kuntz, 1997) auf einem herkömmlichen Rechner.

Einen genetischen Algorithmus zur Platzierung der Liganden in der Bindetasche wird in dem Programm GOLD (*Genetic Optimisation for Ligand Docking*) (Jones *et al.*, 1995b) verwendet. Die Konformation der Liganden und die Platzierung in der Bindetasche wird durch sogenannte *Chromosomen*^a repräsentiert, wobei ein Chromosom für die Ligandenkonformation und ein Chromosom für die Proteinkonformation kodiert. Analog dem Evolutionsprozess werden genetische Operatoren für Mutationen oder *crossover*^b eingesetzt, die zusammen mit einer *fitness*-Funktion über die Entwicklung der Population aus Protein-Ligand-Anordnungen entscheiden. Ein Vorteil gegenüber anderen Docking Programmen besteht in der Flexibilität der terminalen Donor- und Akzeptor-Gruppen innerhalb der Bindetasche des Proteins. Ein Nachteil ist allerdings, daß pro Ligand zwischen 3 und 35 Minuten benötigt werden (Jones *et al.*, 1997).

Das Programm QXP (*Quick Explore*) (McMartin & Bohacek, 1997) stützt sich auf die Verwendung eines Monte-Carlo-Minimierungssatz als Ansatz für das Einpassen der Liganden. Durch zufällige Variation der Torsionswinkel des Liganden und seiner relativen Orientierung zum Protein werden Anordnungen generiert, die im Anschluß mit dem AMBER-Kraftfeld in Gegenwart des Proteins im kartesischen Raum minimiert werden. Das Metropolis-Kriterium entscheidet dann, ob die so erhaltene Konformation im Gegensatz zu ihrer Ausgangskonformation als Startpunkt für einen Zyklus verwendet wird. Die Rechenzeit pro Ligand liegt zwischen 3 Minuten und 3 Stunden (für 7 – 24 drehbare Bindungen) auf einem herkömmlichen Rechner (Workstation).

AUTODOCK (Morris *et al.*, 1996) verwendet bei der Optimierung von Ligandkonformationen innerhalb der Bindetasche ein *simulated-annealing*-Verfahren, d.h. einen temperaturgesteuerten Monte-Carlo-Algorithmus. Ausgehend von einer

^a Bit- bzw. Ganzzahlrepräsentation

^b *crossing over* ist der Austausch von kompletten Chromosombereichen

zufällig gewählten Konformation des Liganden in der Bindetasche wird, wie bei dem Abkühlen einer Schmelze, mit abnehmender Temperatur auch die Abnahme der mittleren Energie der Ligandkonformation in Richtung abnehmender Energie zunehmend stärker begünstigt. Im Idealfall entspricht der Endzustand dem globalen Energieminimum auf einer multidimensionalen Energiehyperfläche. Die Bewertung der einzelnen Protein-Ligand-Komplexe wird hier mit einem Kraftfeld durchgeführt, dessen Parameter dem AMBER-Kraftfeld entnommen wurden. Die benötigte Rechenzeit bei AUTODOCK ist abhängig von der Anzahl der zu berechnenden Torsionswinkel pro Ligand und liegt für 0 bis 10 Torsionswinkel bei 3 bis 26 Minuten.

Ein weiteres Programm zum flexiblen Einpassen von Liganden in die Bindetasche ist LIGIN (Sobolev *et al.*, 1996). Bei diesem Programm werden die Liganden aufgrund von Oberflächenkomplementaritäten in die Tasche gedockt. LIGIN ist mit einem simplen Ansatz in der Lage auch Flexibilitäten der Seitenketten innerhalb der Bindetasche zu berücksichtigen. Abhängig von der Anzahl der Atome werden 3 bis 20 Minuten pro Molekül Rechenzeit benötigt.

Das Programm PRO_LEADS (Westhead *et al.*, 1997) passt, ähnlich wie DOCK, FLEXX und HAMMERHEAD, Liganden flexibel in eine Bindetasche und bewertet die Platzierung anhand einer Abschätzung der Freien Bindungsenthalpie (ΔG^0) des generierten Protein-Ligand-Komplexes. Die Auswahl der zufällig generierten Konformationen wird mit einem *tabu*-Suchalgorithmus und einer simplen Bewertungsfunktion durchgeführt (Baxter *et al.*, 1998; Baxter *et al.*, 2000). Ausgehend von einer Liste bewerteter Konformationen wird die Konformation mit der niedrigsten Bindungsenergie gewählt, um sogenannte „moves“ innerhalb der Bindetasche zu erzeugen. Diese so erhaltene neue Konformation wird wiederum bewertet und nur dann in die Liste aufgenommen, wenn die Konformation sich deutlich von den bereits vorhandenen unterscheidet oder insgesamt eine niedrigere Wechselwirkungsenergie aufweist. Nach einer vorgegebenen Anzahl an Iterationen wird die „beste Lösung“ anschließend mit einem *Simplex*-Algorithmus minimiert. Die benötigte Rechenzeit auf einer herkömmlichen Workstation (Rechner) liegt bei ca. 6 Minuten pro Ligand.

Unter diesen Programmen verfolgen FLEXX (Rarey *et al.*, 1996a) (Kapitel 2.3.3), DOCK (Makino & Kuntz, 1997) und HAMMERHEAD (Welch *et al.*, 1996) eine alternative Strategie, nach der ein potentieller Ligand fragmentiert und zunächst in Form eines ausgewählten Basis- bzw. Kopffragmentes^a in einer günstigen Orientierung plziert wird. Der gesamte Ligand wird dann inkrementell aufgebaut, wobei nur Konformationen mit niedriger Energie und optimalen Wechselwirkungen des Liganden

^a Bei FLEXX wird das Fragmente, mit dem der Aufbau eines Liganden in der Bindetasche begonnen wird, als Basisfragment, bei HAMMERHEAD als Kopffragment bezeichnet.

in der Bindetasche berücksichtigt werden. Das Verfahren von FLEXX verläuft iterativ und kann mehrere Entscheidungsbäume beim inkrementellen Aufbau durchlaufen. Die benötigten Rechenzeiten zum Einpassen eines Liganden liegen bei HAMMERHEAD zwischen 0.5 und 6 Minuten abhängig von der Anzahl der Torsionswinkel und bei FLEXX durchschnittlich bei 1.5 Minuten pro Molekül.

Der Erfolg computergenerierter Vorhersagen von Ligand-Protein-Komplexen wird u.a. von der Qualität der Modelle und Algorithmen abhängen, die in der Lage sind, die Flexibilität der Bindetasche und des Liganden sowie die Protonierung beider erfolgreich zu behandeln. Die genaue Vorhersage und Platzierung von Wasser in der Bindetasche (Kapitel 2.7) spielt ebenso eine entscheidende Rolle wie die Beschreibung der unterschiedlichen Wechselwirkungen zwischen Ligand und Protein. In diesem Zusammenhang steht die Verbesserung der Methoden, die die Gibbsche Freie Energie (auch als Freie Gibbs-Bindungsenthalpie ΔG^0 bezeichnet) eines computergenerierten Protein-Ligand-Komplexes und damit die Bindungsaffinität des Liganden aus der Geometrie vorhersagen. Voraussetzung dafür sind eine große Anzahl an strukturell, thermodynamisch und kinetisch bestimmten Protein-Ligand-Komplexen (Tame, 1999). Die Entwicklung dieser „Scoring-Funktionen“ für die computergestützte Suche in Ligand-Datenbanken ist somit Gegenstand aktueller Forschungsbemühungen (Kapitel 2.4.2).

1.5.5 Bewertung (Scoring)

Die nicht kovalente, reversible Assoziation von Rezeptor R und Ligand L zu einem Rezeptor-Ligand-Komplex RL findet im allgemeinen in wässriger, elektrolythaltiger Lösung statt.



Stellt sich bei dieser Reaktion ein thermodynamisches Gleichgewicht ein, so läßt sich die Freie Standardenthalpie der Bindung ΔG^0 (Gibbsche Freie Enthalpie, freie Gibbs-Bindungsenthalpie) aus der experimentell ermittelten Dissoziations- K_d bzw. Inhibitonskonstante K_i bestimmen (Gleichung 8).

Gleichung 7

$$K_d = K_i = \frac{[R]_{aq.} [L]_{aq.}}{[RL]_{aq.}}$$

Gleichung 8

$$\Delta G^0 = \Delta H^0 - T\Delta S^0 = -RT \ln(K_i)$$

Die Freie Gibbs-Bindungsenthalpie ΔG^0 (Gleichung 8) setzt sich aus einem enthalpischen ΔH^0 und einem entropischen $T\Delta S^0$ Anteil zusammen. T steht für die absolute Temperatur. Die experimentell bestimmten Bindungskonstanten K_i liegen typischerweise im Bereich von 10^{-2} bis 10^{-12} M. Dies entspricht einer Gibbs-Bindungsenthalpie von -10 bis -80 kJ/mol in wässrigen Lösungen. Faktoren, die die Affinität eines Liganden beschreiben, sind u.a. Wasserstoffbrückenbindungen, elektrostatische bzw. van-der-Waals-Wechselwirkungen, Solvation und hydrophobe Effekte (Böhm & Klebe, 1996). Mit Methoden der statistischen Thermodynamik ist man in der Lage ΔG^0 -Werte von Protein-Ligand-Komplexen zu approximieren (Kollman, 1993). Der Rechenaufwand ist jedoch verhältnismäßig hoch, um damit sinnvolle Suchen in großen Datenbanken vorzunehmen. Zur Vereinfachung kann die Freie Bindungsenthalpie ΔG^0 in additive Terme zerlegt und empirisch kalibriert werden (Dill, 1997). Dieses Konzept wurde von Böhm (Böhm, 1994) mit der Funktion SCORE1 verwirklicht, in der einzelne Energiebeiträge (Kapitel 2.4) anhand von 45 experimentell bestimmten Protein-Ligand-Komplexen kalibriert wurden. Zur Anwendung kommt diese Funktion in den Programmen LUDI (Böhm, 1992a) (Kapitel 2.5.3) und FLEXX (Rarey *et al.*, 1996a) (Kapitel 2.3.3). Solche regressionsbasierten Scoring-Funktionen sind aufgrund ihres geringen Rechenaufwandes gut für Datenbanksuchen geeignet. Bei der Vorhersage der K_i -Werte ist jedoch die erreichbare Genauigkeit abhängig von der Qualität und Allgemeingültigkeit des zu ihrer Ableitung verwendeten Datensatzes. Außerdem erweisen sich die regressionsbasierten Scoring-Funktionen als unzulänglich im Hinblick auf eine Diskriminierung unterschiedlich berechneter Bindungsmodi. Allgemein werden Fehlerfaktoren von 1.3 logarithmischen Einheiten (Böhm, 1998) bzw. 10-15%igen Abweichung bei der Vorhersage der ΔG^0 -Werte als momentane Grenze der Vorhersagegenauigkeit beschrieben (Tame, 1999). Bei der Bestimmung der experimentellen Werte sind Schwankungen bis zu einem Faktor 5 (≈ 4 kJ/mol) publiziert, die daraus resultierende Unsicherheit begrenzt alle Bemühungen einer theoretischen Beschreibung von Bindungsdaten (Böhm, 1998). Ein Einsatz zur Suche nach neuen Leitstrukturen scheint somit sinnvoll, die Optimierung von Leitstrukturen benötigt allerdings höhere Genauigkeiten bei der Vorhersage von Bindungsaffinitäten. Momentan ist es jedoch noch problematisch von einem Satz strukturell sehr ähnlicher Verbindungen, die sich beispielsweise nur durch ein Atom unterscheiden, eine korrekt bewertete Reihung zu erhalten (Murray *et al.*, 1998).

Eine Alternative bei der Entwicklung einer universellen Scoring-Funktion stellen die wissensbasierten Ansätze dar, die mit statistischen Verfahren auf die strukturelle Vielfalt in kristallographisch bestimmten Protein-Ligand-Komplexen zurückgreifen.

Exemplarisch sind hier die Scoring-Funktionen von Mügge *et al.* PMF-SCORE (*potential of mean force*) (Muegge *et al.*, 1999), die aus 697 kristallographisch bestimmten Protein-Ligand-Komplexen abgeleitet wurde und die in der vorliegenden Arbeit eingesetzte Bewertungsfunktion DRUGSCORE (Gohlke *et al.*, 2000) (2.4.2) zu nennen. DRUGSCORE verwendet distanzabhängige Atompaar-Präferenzen und Einteilchen-Präferenzen zur Beschreibung der Lösungsmittel-zugänglichen Oberflächenbeiträge in Protein-Ligand-Komplexen. DRUGSCORE zeigt bei der Auswahl derjenigen Lösungen aus einer Anzahl von Docking-Studien, die dem experimentellen Bindungsmodus entsprechen, eine deutliche Verbesserung gegenüber SCORE1 und SCORE2 (Böhm, 1998), sowie FLEXX und der in DOCK implementierten Scoring-Funktion. Ergebnisse, die in dieser Arbeit mit DRUGSCORE erhalten wurden, konnten diese Verbesserung gegenüber FLEXX ebenso bestätigen (Kapitel 3.1.8).

Ein weiterer Ansatz, eine universelle Bewertungsfunktion zu entwickeln, besteht in der Verknüpfung der relativen Reihung von Bindungsmodi aus mehreren bekannten Bewertungsfunktionen zu einem *consensus*-Scoring-Wert (Charifson *et al.*, 1999). Da jede Bewertungsfunktion auf unterschiedlichen Annahmen beruht und nach mehreren Kriterien die erzeugte Geometrien bewertet, besteht die Hoffnung, daß eine UND-Verknüpfungen der Bewertungen aus diesen Ansätzen mit erhöhter Zuverlässigkeit eine korrekte Abschätzung der Bindungsaffinität wiedergibt. CSCORE (*Consensus Score*) eine in SYBYL (Tripos, 2000a) eingesetzte *consensus*-Scoring-Funktion besteht beispielsweise aus den folgenden vier Scoring-Funktionen: G_SCORE (Jones *et al.*, 1997), D_SCORE (Kuntz *et al.*, 1982), PMF_SCORE (Muegge *et al.*, 1999) und CHEMScore (Eldridge *et al.*, 1997).

2 Material und Methoden

2.1 Biochemische Methoden

2.1.1 Chemikalien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und Materialien sind, soweit nicht anders beschrieben, von Sigma-Aldrich/Fluka (Seelze), Merck (Darmstadt), Riedel de Haen (Seelze), Roth (Karlsruhe), Hampton Research (USA) bezogen worden. Für die bei der Kristallisation eingesetzten Puffer wurde bidestilliertes durch Microfilter gereinigtes Wasser verwendet. Für die biochemischen Testungen (Assays) wurde durch Mircofilter gereinigtes deionisiertes Wasser verwendet.

2.1.2 Aufbereitung des Proteins

Die aus humanen Erythrozyten gewonnene CAII ist als gereinigtes und lyophilisiertes Protein bei der Firma Sigma-Aldrich erhältlich (C 6165). Das Protein wird als farbloser kristalliner Feststoff geliefert. Um Salze zu entfernen, die die Kristallisation stören können, wurde der Feststoff zunächst in einer Pufferlösung (20mM Tris-HCl, pH 8.0, 20mM NaCl) aufgenommen. Im Anschluß wurde die Proteinlösung dann in einer Zentrifugenfilterröhre (Porengröße 10kDa) (Centricon YM-10, Millipore Cop., Bedford, MA, USA) bei 4500U/min und 6°C zentrifugiert, wodurch das Protein aufkonzentriert werden konnte. Durch mehrmaliges Verdünnen der Pufferlösung und wiederholtes Aufkonzentrieren konnten störende Salze entfernt werden.

2.1.3 Quantitative Gehaltsbestimmung des Proteins

Die Gehaltsbestimmung der humanen CAII erfolgte photometrisch durch Messung der Absorption bei 280 nm. Dabei wurde der Absorptionskoeffizient aus der Aminosäure-Sequenz der humanen CAII berechnet (Cantor & Schimmel, 1980):

$$1 \text{ mg/ml (34,2}\mu\text{M) humane CAII (w.t.)} = 1.720 A_{280}$$

2.1.4 *In vitro* Enzymassays der Carboanhydrase II

Ein für die CAII beschriebener kompetitiver Fluoreszenzassay (Chen & Kernohan, 1967; Nair *et al.*, 1995) basiert auf der Zunahme an Ligand-Fluoreszenzintensität bei der Bildung des Dansylamid^a-CAII-Komplexes. Die Anregung erfolgt hier bei 280nm und die Emission bei 470nm. Dieser kompetitive Enzymassay beruht auf der Verdrängung des Dansylamids aus dem Enzym-Komplex durch mögliche Inhibitoren und resultiert in einer Abnahme der Fluoreszenz bedingt durch die Konzentrationsabnahme des Enzym-Dansylamid-Komplexes.

Ein CO₂-Hydratationassay (Maren, 1960) ist ein weiterer *in vitro* Enzymassay der CAII. Dieser kompetitive Assay beruht auf der Umsetzung des Substrates CO₂. In einer speziellen Gasblasenzelle wird CO₂-gesättigtes Wasser mit dem Indikator Phenolrot versehen, um nach Zugabe des präinkubierten Enzym-Inhibitor-Komplexes mit Pyrimidin-2,4,6-trion-Puffer (Babitsäure-Puffer) die Reaktion zu starten. Die Zeit bis zum Farbumschlag des Indikators wird dann mit einer Stoppuhr gemessen.

Der in dieser Arbeit verwendete *in vitro* Enzymassay zur Bestimmung von IC₅₀-Werten beruht auf der Esteraseaktivität der CAII (Pocker & Stone, 1967). Eine CAII katalysierte Hydrolyse von farblosen p-Nitrophenolacetat, als nicht natürliches Substrat, zu gelben p-Nitrophenol wird bei 405nm mit einem UV-Spektrometer photometrisch vermessen. Dieser kompetitive Assay wird durch die Zugabe von p-Nitrophenolacetat zu dem präinkubierten Enzym-Inhibitor-Komplex gestartet. Abhängig von der Affinität des Inhibitors verläuft die Umsetzung von p-Nitrophenolacetat zeitlich verzögert ab, daraus resultiert eine entsprechend verlangsamte zeitabhängige Zunahme der Absorption durch p-Nitrophenol.

^a 5-Dimethylaminonaphtalen-1-sulfonamid (DNSA)

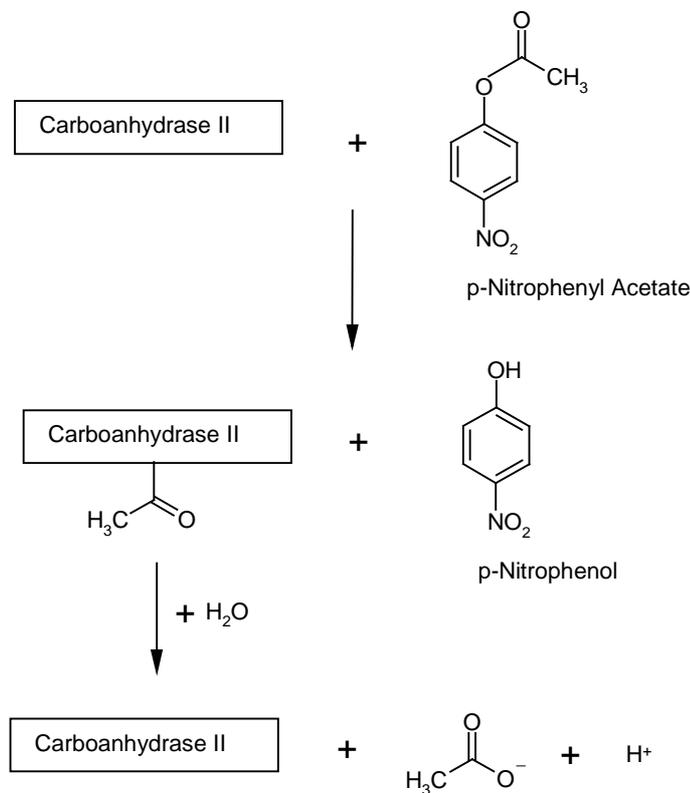


Abbildung 9 Schematisch Darstellung der katalytischen Esterasereaktion der CAII zur Bestimmung von IC₅₀-Werten.

2.1.4.1 Bestimmung von IC₅₀

Die Inhibitorkonzentration, bei der 50% des Enzyms inhibiert vorliegt (IC₅₀), wurde mit dem im vorherigen Kapitel beschriebenen Esteraseassay für die im virtuellen Screening gefundenen und als Vorschläge gewerteten Verbindungen bestimmt. Zur Bestimmung von IC₅₀-Werten werden sogenannte Dosis-Aktivität-Diagramme (dose-response-plots) ausgewertet (Abbildung 10). Gewöhnlich wird bei diesen Plots auf der Y-Achse die Enzymaktivität als Änderung der Absorption und auf der X-Achse die logarithmierten Inhibitorkonzentrationen eines Inhibitors aufgetragen (Copeland, 1996). Gemessen werden die Enzymaktivität als Anfangssteigung für die Reaktion in Gegenwart von verschiedenen Inhibitorkonzentrationen, sowie für die nichtinhibierte Reaktion. Die Enzym- und Substratkonzentration bleiben bei allen Messungen konstant. Um den IC₅₀-Wert zu bestimmen, wird eine Funktion verwendet, die die Änderung des Signals in Abhängigkeit von der Inhibitorkonzentration beschreibt (Copeland, 1996) (Gleichung 9). Am Wendepunkt der sigmoidalen Kurve wird der eigentliche IC₅₀-Wert

ermittelt. Zur Auswertung der Plots mittels nichtlinearer Regression der Gleichung 10 wurde das Programm GRAPHFIT (Leatherbarrow, 2000) verwendet.

Gleichung 9

$$y = \frac{R}{1 + \left(\frac{[I]}{IC_{50}}\right)^S} + h$$

S : Slopefaktor (Steilheit der Kurve)

R : Range (Maximum der Kurve)

$[I]$: Inhibitorkonzentration

h : Hintergrund

Die Aktivität der CAII gegenüber dem nicht natürlichen Substrat *para*-Nitrophenolacetat ist gering, daher wird zur Aktivitätsbestimmung eine hohe Enzymkonzentration benötigt. Dies wiederum hat zur Folge, daß die freie Inhibitorkonzentration (Menge an frei in Lösung vorliegenden Inhibitor) geringer ist als die ursprünglich eingesetzte Konzentration. Ein Teil des Inhibitors ist nach dem Massenwirkungsgesetz mit der Gleichgewichtskonstante K_i unspezifisch an das Enzym gebunden und liegt somit nicht mehr in Lösung als freier Inhibitor vor. Die freie Inhibitorkonzentration $[I]_{frei}$ wurde daher mit der Gleichung 10 (Cornish-Bowden, 1995) berechnet, bei der $[I]$ die Inhibitorkonzentration ist und $[E]$ die Enzymkonzentration.

Gleichung 10

$$[I]_{frei} = \frac{([I] + [E] + IC_{50}) - \sqrt{([I] + [E] + IC_{50})^2 - (4 \cdot [I] \cdot [E])}}{2}$$

Zur Korrektur der Inhibitorkonzentration hätte eigentlich K_i gegeben sein müssen. Für unbekannte Inhibitoren wird K_i jedoch aus den angepaßten IC_{50} -Werten ermittelt, um mit der so korrigierten Inhibitorkonzentration eine verbesserte Bestimmung der IC_{50} -Werte zu erreichen. Dieser Prozeß wurde iterativ bis zur Selbstkonsistenz der IC_{50} -Werte durchgeführt. Somit wird berücksichtigt, daß bei Inhibitorkonzentrationen unterhalb der Enzymkonzentration nur ein Teil des Enzyms abgesättigt werden kann, obwohl der IC_{50} noch nicht erreicht ist. Diese Verfahren wurde für alle Inhibitoren durchgeführt.

Zur Durchführung der Einzelmessungen wird für jeden Inhibitor eine Verdünnungsreihe angesetzt. Hierzu wurde zunächst eine 1 M Lösung aus 50% (v/v) DMSO/H₂O-Lösung und Inhibitor angefertigt. Aus dieser Lösung wurde wiederum soviel Flüssigkeit entnommen, daß eine 10mM Lösung des Inhibitors in Puffer (10mM Tris-SO₄, 90mM NaSO₄, pH 8.0) und gelöstem Inhibitor erhalten wurde. Die Verdünnungsreihen bestanden in der Regel aus den folgenden Inhibitorkonzentrationen:

0.1mM, 80µM, 50µM, 30µM, 10µM, 7µM, 5µM, 3µM, 1µM, 700nM, 500nM, 300nM, 100nM, 50nM, 30nM, 20nM, 10nM 5nM, 1nM. Gemessen wurden die Reaktionen bei 25°C in einer hochtransparenten Polystyrolmicrotiterplatte bestehend aus 96 Reaktionsgefäßen (Greiner GmbH, Deutschland) bei 405nm mit dem UV-Spektrometer POLARSTAR (BMG Lab Technologies, Offenburg, Deutschland). Eine typische Zusammensetzung der Lösung in einem Reaktionsgefäß bestand aus 30µl Inhibitor entsprechender Konzentration, 30 µl Proteinlösung (1.4µM CAII, 10mM Tris-SO₄, 90mM NaSO₄, pH 8.0), 30 µl Substrat (2.5mM p-Nitrophenolacetat gelöst in Acetonitril) und 210µl Puffer. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Substrat nach einer Präinkubationszeit von 10min gestartet. Alle Messungen wurden mindestens viermal wiederholt. Die Fehlergrenzen des angepaßten Funktionsverlaufs (*Fit*) durch die nichtlineare Regression (Gleichung 9) wurde mit dem Programm GRAPHFIT bestimmt.

Die Validierung des Assays wurde mit Acetazolamid **1** durchgeführt, der in der Literatur angegeben IC₅₀-Wert von 3.4nM (Surgue *et al.*, 1997) konnte mit 6.7±0.9nM reproduziert werden (Abbildung 10).

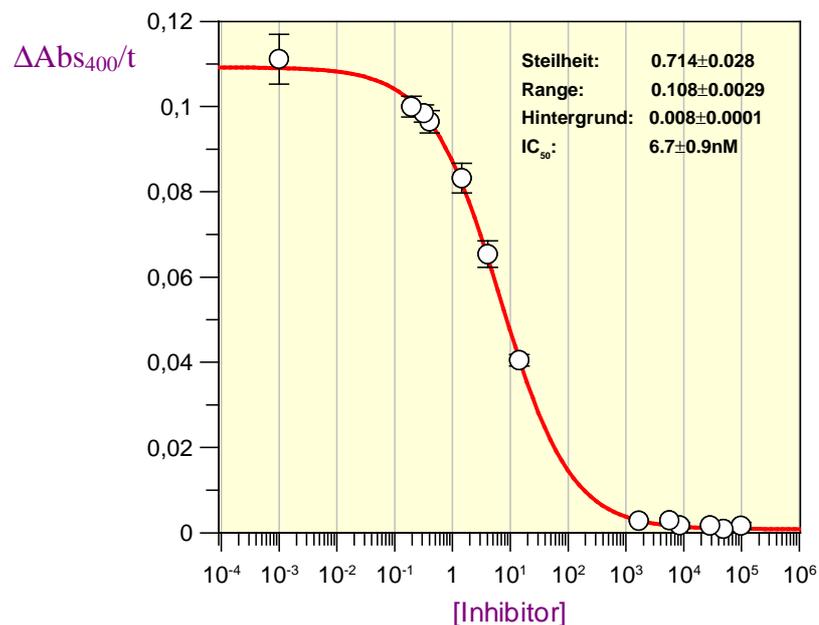


Abbildung 10 Dosis-Aktivität-Diagramm von Acetazolamid **1** als Referenz.

2.2 Proteinstrukturaufklärung

Die Röntgenstrukturanalyse ist eine etablierte Methode zur Aufklärung von Proteinstrukturen. Eine notwendige Voraussetzung für die Strukturbestimmung mittels Röntgenbeugung ist die erfolgreiche Kristallisation des Proteins. Kleinere Proteine können mit Hilfe der mehrdimensionalen NMR-Spektroskopie aufgeklärt werden. Die 3D-Strukturen von Proteinen werden in der PDB (*Protein Data Bank*) (Bernstein *et al.*, 1977) gesammelt.

2.2.1 Kristallisation der humanen CAII

Zur Röntgenstrukturanalyse werden Einkristalle des Proteins benötigt. Daher müssen zunächst Bedingungen gesucht werden, die eine Kristallisation des Proteins ermöglichen. Ziel ist durch Beeinflussung der Löslichkeit des Proteins und durch langsame Änderung der äußeren Bedingungen, eine Übersättigung der Lösung zu erreichen, in der sich Kristallisationskeime und daraus schließlich größere Kristalle bilden.

Durch Hinzufügen eines sogenannten Präzipitanz kann die Übersättigung einer Proteinlösung gefördert werden. Als Präzipitanz werden anorganische Salze, Polyethylenglykole oder Alkohole verwendet. Die Kristallisation ist darüber hinaus abhängig vom pH-Wert der Lösung und der Temperatur. Zur langsamen Veränderung der Konzentration von Protein und Präzipitanz wird das Prinzip der Dampfdiffusion angewendet. Nach der Methode des „hanging drop“ (oder „sitting drop“) wird ein kleines Volumen einer konzentrierten Proteinlösung auf ein Deckglas aufgebracht und durch Hinzufügen einer Lösung des Präzipitanz (Reservoirlösung) verdünnt. Das Deckglas verschließt dann ein Reservoir, in dem sich unverdünnte Präzipitanz/Pufferlösung (Reservoirlösung) befindet, wobei sich der Proteintropfen an der Unterseite des Deckglases überhalb der Reservoirlösung befindet. Bei der Kristallisation der humanen CAII wird das vorliegende Protein zunächst mit dem gleichen Volumen der Reservoirlösung verdünnt. In der geschlossenen Anordnung des „hanging drop“ Systems kommt es dann zu einer Dampfdiffusion von Wassermolekülen. Diese Diffusion dauert so lange bis sich im Tropfen und Reservoirlösung die gleiche Konzentration an Präzipitanz eingestellt hat. Die Kristallisation erfolgt in einem pH-Wertebereich von 8.2-8.5 und bei einer Temperatur von 6°C.

Folgende Bedingungen wurden angewendet: 7µl humane CAII (8.7mg/ml (0.3mM) in 20mM Tris-HCl, pH 8.0, 20mM NaCl) wurden mit dem gleichen Volumen

Kristallisationspuffer (100mM Tris-HCL, pH 8.5, 300mM NaCl, 2.7M $\text{NH}_4(\text{SO}_4)_2$, 5mg $\text{CH}_3\text{HgO}_2\text{CCH}_3$ (pro Vertiefung)) auf einem Deckglas vermischt. Das anschließend umgedrehte Deckglas wurde über die Vertiefung einer 24er Kristallisationsplatte (Hampton Research, USA) luftdicht mit Hilfe von Silikonpaste (mittelviskos, Bayer-Silikon) befestigt. In der Vertiefung befanden sich 1ml des gleichen Kristallisationspuffers. Die Platte wurde erschütterungsfrei bei 6°C aufbewahrt und nach ca. 2-3 Wochen konnten Kristalle geerntet werden. Da diese Kristalle in der Regel sehr verwachsen waren, wurden „Äste“ des Kristalls von ausreichender Größe vorsichtig abgebrochen und für die Röntgenstrukturanalyse verwendet (Abbildung 11).

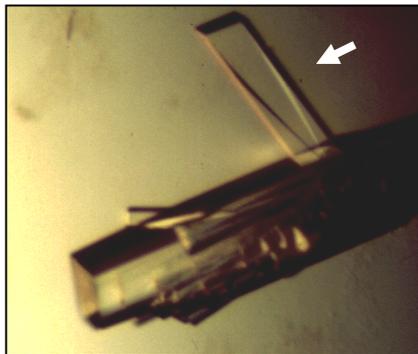


Abbildung 11 Foto eines unter oben beschriebenen Bedingungen erhaltenen Kristalls. Die Größe des verwendeten Kristalliten (Pfeil) beträgt ca. 0.35mm x 0.1mm x 0.1mm.

2.2.2 Soaking von CAII-Kristallen mit Inhibitoren

Die Diffusion von kleinen Molekülen in die Bindetasche des Proteins („Soaking“) ist möglich, da Proteinkristalle in der Regel große Wasserkanäle zwischen den Proteinmolekülen enthalten. Für ein Soaking ist die Voraussetzung, daß ein solcher Wasserkanal bis an die Bindungstasche des Enzyms heranreicht und weiterhin im Kristall ihre katalytische Funktion behalten. Bindet ein eindiffundierter Inhibitor, kann der Bindungsmodus des Moleküls durch Röntgenstrukturanalyse bestimmt werden. Da die organischen Verbindungen für ein „Soaking“ in wäßrigem Puffer nur eingeschränkt löslich sind, müssen diese zuvor in Dimethylsulfoxid (DMSO) angelöst werden. Das „Soaking“ in der unverdünnten DMSO-Lösung führt in der Regel zum Aufbrechen des eingebrachten Proteinkristalls, so daß ein Verdünnen der DMSO-Lösung mit Puffer erforderlich ist. Die Proteinkristalle der humanen CAII zerbrachen allerdings auch bei verdünnten DMSO-Lösungen, so daß erst der Verzicht auf DMSO und der Einsatz von Ultraschall und Wärme zum Anlösen der organischen Verbindungen den gewünschten Erfolg brachte. Für das „Soaking“ wurden daher folgende Bedingungen angewendet: die organische Verbindung wurde in der Pufferlösung (100mM Tris-HCL, pH 8.5, 300mM

NaCl, 2.7M $\text{NH}_4(\text{SO}_4)_2$) 10min in einem Ultraschallbad behandelt und anschließend 10min bis zu 80°C erwärmt. Nach Entfernen eines eventuellen Rückstandes (ungelöste organische Verbindung) durch Zentrifugation, wurden 3 μl der erhaltenen klaren Lösung vorsichtig in 1 μl -Schritten zu einem Tropfen von 14 μl Kristallisationspuffer mit Proteinkristall pipettiert. Dieser

Tropfen wurde nach der „hanging drop“ Methode (Kapitel 2.2.1) über 1ml Reservoirlösung (100 mM Tris-HCl, pH 8.5, 300mM NaCl, 2.7M $\text{NH}_4(\text{SO}_4)_2$, $\text{CH}_3\text{HgO}_2\text{CCH}_3$) bis zu maximal drei Tage bei 6°C aufbewahrt.

2.2.3 Sammlung von Datensätzen

Die Strukturbestimmung von CAII-Inhibitor-Komplexen erfolgte durch Röntgenbeugung, wobei der Kristall mit einem fokussierten, monochromatischen Röntgenstrahl (Primärstrahl) belichtet wurde. Der in der Pufferlösung schwimmende Kristall wurde zunächst in die Mitte einer Glaskapillare (0.5mm Durchmesser, 0.01mm Wandstärke, 5cm Länge, Fa. W.Müller, Deutschland) gebracht. Anschließend wurde dem Kristall soviel Pufferlösung entzogen, daß dieser an der Innenwand der Kapillare haften blieb. Um den Proteinkristall während der Messung vor der Austrocknung zu schützen, wurde ein kleines Pufferreservoir in der Kapillare belassen und diese dann mit Wachs verschlossen. Mit Knetmasse wurde die Kapillare schließlich auf dem Goniometerkopf fixiert und in den Röntgenstrahl gebracht. Der Primärstrahl (CuK_{α} -Strahlung, 1,543Å) wurde mit einem Drehanoden-Generator (Rigaku RU300, MSC, USA) erzeugt, der auf eine Leistung von 50kV und 100mA eingestellt und an einem Spiegelsystem (Yale Mirrors, MSC, USA) auf den Kristall fokussiert wurde. Die Detektion der Intensitäten abgebeugter Reflexe erfolgte elektronisch (RAXIS-IV Image Plate System, MSC, USA), wobei der Kristall-Detektor-Abstand 100mm betrug. Zur Aufnahme eines Beugungsbildes wurde der Kristall für 5min mit dem Primärstrahl bestrahlt und dabei schrittweise um 1° gedreht. Die Datenreduktion erfolgte mit den Programmen DENZO und SCALEPACK (Otwinowski, 1993).

2.2.4 Verfeinerung der Datensätze

Zur Strukturlösung von CAII-Inhibitor-Komplexen wurde die Kristallstruktur der apohumanen CAII (PDB-Code: **2CBA**) (Hakansson *et al.*, 1992) als Startmodell verwendet. Die kristallographische Verfeinerung und die Berechnung der Elektronendichten ($2F_o - F_c$ bzw. $|F_o - F_c|$) von Datensätzen bis zu einer Auflösung von 2.4Å erfolgte mit dem Programm X-PLOR. Das Programm X-PLOR minimiert eine Funktion mit zwei unterschiedlichen Termen, die über eine mathematische Gewichtung gekoppelt sind. Zum einen wird die Abweichung des Modells von der „gemessenen“ Elektronendichte

minimiert, die beschrieben ist durch die Differenz der gemessenen und den aus dem Modell berechneten Strukturamplituden. Zum anderen wird ein Energieterm minimiert, der durch die Geometrie der Struktur bestimmt wird. In einem Kraftfeld sind Bindungslängen, -winkel und einige andere energetische Wechselwirkungen parametrisiert. Das in X-PLOR verwendete Kraftfeld basiert auf Parametern, die aus hochaufgelösten Modellstrukturen abgeleitet wurden (Engh & Huber, 1991). In den hier verfeinerten Strukturen befand sich ein Molekül in der asymmetrischen Einheit. Die optimale Positionierung der Strukturen erfolgte in X-PLOR durch „rigid-body“ Minimierung, wobei das Molekül als starre Einheit rotiert und translatiert wurde. In mehreren Zyklen wurde das Modell durch Verfeinerung der individuellen Atompositionen mit Hilfe der konjugierten Gradientenmethode („positional refinement“) soweit verbessert, daß der R-Faktor (Gleichung 11) unter 20 % lag.

Gleichung 11

$$R_{\text{Faktor}} = \frac{\sum (|F_{\text{obs.}}| - |F_{\text{calc.}}|)}{\sum |F_{\text{obs.}}|}$$

In dieser Gleichung sind $F_{\text{obs.}}$ beobachtete Strukturamplituden, $F_{\text{calc.}}$ berechnete Strukturamplituden. Die manuellen Korrekturen des Proteinmodells und die Modellierung der Inhibitorstrukturen in die Differenzelektronendichte erfolgte mit dem Programm O (Jones *et al.*, 1991). Die 3D-Strukturen der Inhibitoren wurden mit dem Programmpaket SYBYL generiert und Parameter- und Topologie-Daten für die X-PLOR-Verfeinerung mit dem Programm MOLEMAN (Kleywegt, 1997) erzeugt.

2.3 Datenbanksuchverfahren

2.3.1 UNITY

In SYBYL (Tripos, 2000a) integriert befindet sich das Datenbanksuchprogramm UNITY (Tripos, 2000b). UNITY ist ein komplexes Programmpaket, das dem Benutzer eine Vielzahl an „Werkzeugen“ (Unterprogrammen) zur Verfügung stellt. Diese dienen der Generierung von Molekül-Datenbanken, der Formulierung von verschiedenen Suchanfragen und der Analyse der erhaltenen Treffer. Im Folgenden werden die einzelnen Suchverfahren kurz vorgestellt^a.

Grundsätzlich stehen vier verschiedene Suchverfahren in UNITY zur Auswahl: ein 2D-Suchverfahren, ein 2D-Ähnlichkeitssuchverfahren, ein 3D-Suchverfahren und ein flexibles 3D-Suchverfahren.

Das schnellste dieser Verfahren, bezogen auf die benötigte Rechenzeit, ist die 2D-Suche; ein zweidimensionales Topologie-Suchverfahren bei dem auf eine vorgegebene Konnektivität zwischen bestimmten Atomen in der Datenbank selektiert wird. Die gesuchte Konnektivität der Atome wird in der Regel durch die Verwendung der *Sybyl Line Notation* (SLN)^b (Ash *et al.*, 1997) spezifiziert. Die Suche beruht dann auf dem Vergleich der *fingerprints* (Kapitel 1.5.2) von Anfrage und Datenbank-Molekül. Als Anfrage („query“) werden hier einzelne Moleküle bzw. Molekülfragmente^c verstanden. Die Einschränkung dieses Suchverfahrens besteht darin, daß nur im Rahmen dieser gezielten Anfrage Treffer („hits“) angezeigt werden. Um dennoch eine gewisse strukturelle Vielfalt zu generieren werden verschiedene Moleküle bzw. Molekülfragment in einer Anfrage vereint.

Die 2D-Ähnlichkeitssuche verläuft analog der 2D-Suche mit der Erweiterung, einen Ähnlichkeitsindex („Similarity Index“, *SimIndex*) berechnen zu können. Dieser *SimIndex* beruht auf der Berechnung des Tanimoto-Koeffizienten (Kapitel 1.5.2) und wird in einem Wertebereich von 0 bis 100 angegeben. Als Grundeinstellung („default“) wird in UNITY ein *SimIndex* von 85 vorgeschlagen, dieser Wert entspricht einem Tanimotokoeffizienten von 0.85 und somit der in Kapitel 1.5.2 beschriebenen Grenze zwischen „ähnlichen“ und „unähnlichen“ Molekülen. Ausgehend von einem in der Anfrage verwendeten Molekül/Molekülfragment können bei diesem Verfahren

^a siehe auch *UNITY User Guide* und *UNITY Reference Guide* Version 4.1.2, May 2000

^b Für weitere Erläuterungen zu SLN siehe auch *Tripos SLN Manual*.

^c Molekülfragmente sind Teile eines Moleküls z. B. ein Phenylring ohne H-Atome, eine funktionelle Gruppe, aber auch einzelne Atome

diejenigen Moleküle einer Datenbank gefiltert werden, die einem vorher festgelegten *SimIndex* entsprechen.

Die 3D-Suche ist eine Abstandssuche im Raum und bietet u.a. die Option, räumliche Randbedingungen („constrains“) zu setzen. Es können Abstände festgelegt werden, die zwischen den im Raum verteilten Molekülfragmenten bestehen sollen. Eine Einschränkung dieses Verfahrens besteht darin, daß neben der Konnektivität auch die räumliche Konstellation der gefragten funktionellen Gruppen eines Moleküls mit der Anfrage übereinstimmen muß. Da in den Datenbanken in der Regel nur eine vorgegebene (z.B. durch CORINA berechnete) Konformation eines Moleküls abgelegt ist, bleibt die Anzahl an Treffern stark eingeschränkt.

Erst die Durchführung einer flexiblen 3D-Suche führt zu mehr Treffern, da nun die Modifizierung der Torsionswinkel und damit die Änderung und Anpassung der Konformationen an die Anfrage möglich ist. Die Generierung der Konformationen und die Überprüfung der Übereinstimmung mit der Anfrage wird mit einem *Directed Tweak* (Hurst, 1994) benannten Algorithmus erreicht. Dieser Algorithmus beruht auf der Minimierung der Torsionswinkel der Moleküle und ist in der Lage, innerhalb von nur einer Sekunde bis zu 100 unterschiedliche Moleküle zu verarbeiten. Eine Überprüfung der van-der-Waals-Wechselwirkungen und die Auswahl einer chemisch sinnvollen Konformation findet erst im Anschluß statt. Der Aufbau der Suchanfrage kann bei diesem flexiblen 3D-Suchverfahren in einer abstrahierten Form realisiert werden. Aus Pseudoatomen (z.B. H-Brücken-Donor, -Akzeptor, hydrophobes Zentrum) bestehende Kugeln bzw. Sphären („sphere“) werden im Raum plaziert und können so einen atombasierenden Pharmakophor beschreiben. Als ergänzendes, extrem Rechenzeit intensives Suchkriterium kann der zur Ligandbindung verfügbare Raum in der Bindetasche durch Definition weitere unbedingt unbesetzt verbleibende Sphären („excluded volumes“) miteinbezogen werden. Diese Sphären sollen Treffer aussortieren, die bei einer späteren Einpassung („Docking“) (Kapitel 1.5.4) in die Bindetasche zu einer Überlappung mit Teilen des umgebenden Proteins führen würden.

Bei allen Suchen werden die Treffer („hits“) in eine Trefferliste („hitlist“) oder Tabelle („spreadsheet“) abgelegt und stehen somit für weitere Suchen zur Verfügung.

2.3.2 RIGFit und FLEXS

Eine Alternative zu den mit UNITY durchgeführten Suchverfahren stellt das in dem Programm RIGFIT (Lemmen *et al.*, 1998a) umgesetzte Verfahren dar. Die Suchen bei diesem Programm beruhen auf dem Vergleich von starren Molekülfragmenten. Der Vergleich der Molekülfragmente wird auf der Basis von physiko-chemischen

Eigenschaften^a, die durch atombasierte *Gauss-Funktionen* (Gleichung 12) repräsentiert werden, umgesetzt.

Gleichung 12

$$\rho(\chi) = \sum_{\text{Atom } i} a_i e^{-b(x-x_i)^2}$$

Der Dämpfungsparameter b bleibt bei jeder *Gauss-Funktion* gleich, wobei a_i sich entsprechend der zu repräsentierenden Eigenschaft verändert. Zur Berechnung der Ähnlichkeit von Molekül A und Molekül B wird der Carbó-Index (Kapitel 1.5.3) verwendet.

Gleichung 13

$$Z_{AB} = \int \rho_A(x) \rho_B(x) dx$$

Weiterhin wird von der Annahme ausgegangen, daß Molekül B fixiert im Raum verbleibt, während Molekül A rigide, aber im Raum verschiebbar ist. Somit ist $Z_{AB}(t, \Omega)$ abhängig von der Translation t und der Rotation Ω von Molekül B . Unter diesen Voraussetzungen liest sich der in RIGFIT zur Anwendung kommende Hodgkin-Index (Kapitel 1.5.3) wie folgt:

Gleichung 14

$$H_{AB}(t, \Omega) = \frac{2Z_{AB}(t, \Omega)}{Z_{AA} + Z_{BB}}$$

Werden die *Gauss-Funktionen* von Gleichung 12 in Gleichung 14 eingesetzt erhält man die in SEAL beschriebene Funktion. Werden weiterhin die physiko-chemischen Eigenschaften mit einbezogen, wird der von Klebe *et al.* (Klebe *et al.*, 1994) entwickelte Ansatz erreicht. Durch Transformation der *Gauss-Funktionen* in den Fourier-Raum und unter Verwendung der *Pattersonfunktion* lassen sich die Translation und Rotation getrennt behandeln. Eine Separierung von 6 Freiheitsgraden auf zweimal 3 Freiheitsgrade führt so zu einer gewünschten Beschleunigung. Ein weiterer Rechenzeitvorteil liegt in der Beschränkung auf Molekülfragmente, die nur eine geringe Zahl an Atomen besitzen und eine eingeschränkte Flexibilität aufweisen.

^aSterische Besetzung des Raums, atomare Partialladungen, Hydrophobizität, Potential zur Wasserstoffbrückenbildung.

RIGFIT kann zur fragmentbasierten Suche in Datenbanken genutzt werden, indem ein Molekülfragment, das für die Bindung eines aktiven Moleküls essentiell ist, als Anfrage bzw. Referenz dient. Da der Vergleich der Fragmente auf physiko-chemischen Eigenschaften beruht, besteht die Möglichkeit neue Verbindungen zu finden, die physiko-chemisch ähnliche Fragmente tragen. Weiterhin kann RIGFIT so auch zur Trennung in vermeintlich aktive und inaktive Verbindungen einer Datenbank eingesetzt werden. RIGFIT ist in das Programm FLEXS (Lemmen & Lengauer, 1997; Lemmen *et al.*, 1998b) eingebunden und kann über eine Voreinstellung („flag“) in FLEXS separat genutzt werden.

Das Programm FLEXS gestattet eine flexible Überlagerung zweier Moleküle. Ausgehend von einem rigiden Referenzliganden, der idealer Weise in der biologisch aktiven Konformation vorliegt, wird ein Testligand flexibel superpositioniert. Hierzu wird der Testligand in einzelne kleine, relativ starre Fragmente zerlegt und einem iterativen, inkrementellen Aufbau folgend überlagert. Zuerst wird ein sogenanntes *Basisfragment* des Testliganden mit einer geeigneten Region des Referenzliganden überlagert. Außer dem *Basisfragment* werden alle Fragmente durch die Trennung an rotierbaren Bindung gebildet. Anschließend werden die verbleibenden Fragmente sukzessive mit dem *Basisfragment* verknüpft. Die Reihenfolge, mit der die Fragmente verknüpft werden, wird dynamisch angepasst, abhängig von der jeweiligen Plazierung auf der Referenz. Die Orientierung der einzelnen Fragmente gründet auf der Idee der paarweisen intermolekularen Wechselwirkungen („paired intermolecular interactions“). Das vereinfachte Prinzip hierbei ist, daß vergleichbare funktionelle Gruppen zu überlagernder Liganden mit der gleichen funktionellen Gruppe eines Proteins wechselwirken und somit eine Plazierung über sogenannte Interaktionspunkte im Raum („interaction points“) dirigiert werden kann. „Interaktionspunkte“ modellieren eine hypothetische funktionelle Gruppe des Proteins und erlauben somit eine Orientierung direktonaler Wechselwirkungen (H-Brückendonor/akzeptor) im Raum. Dichtefunktionen sterischer, elektrostatischer, hydrophober und Wasserstoffbrückeneigenschaften, durch *Gauss*-Funktionen approximiert, werden zusätzlich berechnet und dienen neben den „Interaktionspunkten“ der räumlichen Überlagerung. Gleichzeitig wird eine Bewertungsfunktion S optimiert (Gleichung 15).

Gleichung 15

$$S = S_{match} + \Delta S_{vdW} \cdot S_{vdW} + \Delta S_{stm} \cdot S_{stm} + \sum_{property\ p} \Delta S_p \cdot S_p$$

- S_{match} beschreibt den Beitrag, der auf den paarweisen intermolekularen Wechselwirkungen („paired intermolecular interactions“) beruht, wobei drei Typen von Übereinstimmungen m („matches“) berücksichtigt werden: ungeladene Wasserstoffbrückenbindungen, ionische Wechselwirkungen und hydrophobe Wechselwirkungen. Die Funktion p wird verwendet, um Abweichungen von der Ideal- Geometrie zu bestrafen, Δr steht für die Änderung der Bindungslänge, $\Delta\alpha$ für die Änderung des Bindungswinkels.

Gleichung 16

$$S_{\text{match}} = \sum_{\text{match } m} S_m(\text{type}(m)) \cdot p(\Delta r, \Delta\alpha)$$

- S_{vdW} beschreibt den Beitrag, der durch das Überlappungsvolumen der atomaren van-der-Waals Radien bestimmt wird.
- S_p beschreibt den Beitrag, der die durch Gauss-Funktionen approximierten Moleküleigenschaften beinhaltet. Zu diesen Eigenschaften zählen die Elektronendichte, die Partiaalladungen, die Hydrophobizität und die H-Brückenakzeptoren und –donatoren der jeweiligen Verbindung.
- S_{stm} ist der Beitrag, der den inkrementellen Aufbau während der Überlagerung anhand der Größe („size“) der verbleibenden Fragmente so beeinflusst, daß große Teile des Testliganden über großen Teilen des Referenzliganden superpositionieren.

Die Flexibilität der Moleküle wird durch verschiedene diskrete Torsionswinkelsätze (Klebe & Mietzner, 1994) erreicht, die bei der Verknüpfung der rotierbaren Bindungen eingesetzt werden. Die Flexibilität der Ringkonformationen wird durch den Einsatz von CORINA (Sadowski, 1997) gewährleistet. Ein Größennormierung des Ähnlichkeitsmaßes kann nach folgender Gleichung 17 berechnet werden^a:

Gleichung 17

$$(\text{Ähnlichkeitsmaß})_N = \frac{(\text{Ähnlichkeitsmaß})_R}{(\text{Ähnlichkeitsmaß})_S}$$

^a Persönliche Mitteilungen C. Lemmen.

Ähnlichkeitsmaß_R entspricht dem Wert der bei der Überlagerung auf die Referenz erhalten wird. Ähnlichkeitsmaß_S wird durch die Überlagerung der Verbindungen auf sich selbst berechnet und Ähnlichkeitsmaß_N ist der normierte Wert des Ähnlichkeitsmaßes.

Als Alternative zur Überlagerung besonders bei großen Fragmenten mit wenigen funktionellen Gruppen wird der Einsatz von RIGFIT empfohlen (Lemmen *et al.*, 1998b). Aufgrund der u.a. in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse (Kapitel 3.1.7) wurde eine weitere Option in FLEXS implementiert, die die Möglichkeit bietet, durch *Gauss*-Funktionen repräsentierte Eigenschaften von mehreren Referenzliganden zu *einem* „neuen“ Referenzliganden zu vereinen. Sind beispielsweise die Bindungsmodi strukturell unterschiedlicher Liganden innerhalb derselben Bindetasche aufgeklärt, so bietet diese Anwendung die Möglichkeit durch Vereinigung der *Gauss*-Funktionen, bei einer Datenbanksuche die Bindungsmodi der jeweiligen Liganden zu berücksichtigen. Da die direktionalen Wechselwirkungen weiterhin nur durch einen der beiden Liganden bestimmt werden können, ist der Einfluß der „vereinigten“ *Gauss*-Funktionen jedoch nur eingeschränkt wirksam (siehe auch Kapitel 3.1.7).

2.3.3 FLEXX

Der Docking-Algorithmus in FLEXX (Rarey *et al.*, 1999a; Rarey *et al.*, 1996a; Rarey *et al.*, 1996b) verfolgt eine inkrementelle Aufbaustrategie zum Einpassen von flexiblen Liganden in eine rigide Proteinbindetasche. Zunächst erfolgt eine Analyse der Bindetasche, die anschließend durch Sätze von Wechselwirkungspunkten mit definierten Eigenschaften (Wasserstoffbrücken, Salzbrücken, Metallkontakte, hydrophobe Kontakte) als räumliche Verteilung in Form von Kugeln, Kugelkappen, Kugelschichten oder sphärischen Rechtecken repräsentiert werden. Anschließend werden verschiedene Wechselwirkungspunkte dieser so erzeugten Bereiche zu gleichschenkligen Dreiecken zusammengefaßt. Der Ligand wird ebenfalls analysiert und durch Wechselwirkungszentren repräsentiert, die ebenfalls zu Dreiecken zusammengefaßt werden. Zur Überlagerung von Ligandteilen (Fragmenten) auf die Zentren in der Bindetasche kommt es, wenn kongruente Dreiecke mit geometrisch und physiko-chemisch identischen Wechselwirkungszentren/punkten identifiziert werden. Im Anschluß werden die Wechselwirkungsgeometrien der Fragmente überprüft und eine Überlappung der Fragmente mit dem Protein ausgeschlossen. Weiterhin werden ähnliche Plazierungen zusammengefaßt, wobei als Kriterium die räumliche RMS-

Abweichung^a der Fragmente dient. Die freie Bindungsenergie der konfliktfreien Platzierung wird mit Hilfe einer empirischen Bewertungsfunktion (Kapitel 2.4) abgeschätzt.

Analog zu FLEXS wird in FLEXX ein inkrementeller Konstruktionsalgorithmus verwendet, der zunächst das zu dockenden Molekül anhand drehbarer Bindungen in kleine, rigide Fragmente zerlegt. Ein automatisch ausgewähltes *Basisfragment*, bestehend aus möglichst vielen direktionalen Wechselwirkungen in der Bindetasche wird von FLEXX unabhängig vom Rest des Liganden in alternativen Bindungsposen innerhalb der Bindetasche plaziert. Der sukzessive Aufbau des Liganden in der Bindetasche erfolgt nun ausgehend von den energetisch am besten bewerteten Platzierungen der gewählten *Basisfragmente*. Der sequentielle Aufbau des gesamten Liganden erfolgt unter Berücksichtigung aller alternativen Verknüpfungsmöglichkeiten des nächsten Fragmentes. Nach Platzierung des *Basisfragmentes* werden schrittweise entlang eines Entscheidungsbaums weitere starre Fragmente angefügt.

Die Flexibilität wird dadurch generiert, daß an jeder Verknüpfungsstelle weitere Torsionswinkel auf einem diskreten Raster durchprobiert werden. Es werden solche Winkel vorgegeben, die sich aufgrund statistischer Auswertungen der Konformationen niedermolekularer Verbindungen in Kristallstrukturen als günstig abzeichnen (Klebe & Mietzner, 1994). Der Aufbau aller möglichen Konformere und die anschließende Überprüfung führt zu einer baumartige Suchstrategie, wobei jeder Pfad entlang des Baums eine alternative Position des Liganden in der Bindetasche erzeugt. Pfade, die zu sterisch ungünstigen Platzierungen führen, werden verworfen und nur die Wechselwirkungen der Fragmente aus den übrigen Pfaden werden analysiert. Die freie Bindungsenergie des Liganden, der sich aus der Verknüpfung der partiellen Fragmente ergeben würde, wird abgeschätzt. Die so selektierten Platzierungen der partiell aufgebauten Liganden werden zusammengefaßt und in den nächsten Zyklus übernommen. Dieser Vorgang läuft so lange weiter, bis alle Fragmente addiert worden sind und der gesamte Ligand in der Bindetasche plaziert wurde. Von den gefundenen Platzierungen werden die freien Bindungsenergien mit der empirischen Bewertungsfunktion (Kapitel 2.4.1) abgeschätzt und in einer Rangliste angeordnet.

Anhand von 200 kristallographisch ermittelten Protein-Ligand-Komplexen wurde FLEXX validiert (Kramer *et al.*, 1999). Dabei wurde der experimentell gefundene

^a Definition des RMS (engl. root mean square)-Wertes:

$$RMS = \sqrt{\left(\sum_i^n d_i^2 \right) / n}$$

d: Abstand korrespondierender Atome

n: Anzahl der Atome

Bindungsmodus in 80% der Fälle mit einer RMS-Abweichung $<2.0\text{\AA}$ reproduziert, in 50% der Fälle wurden RMS-Abweichung $<1.0\text{\AA}$ gefunden. Die durchschnittliche Rechenzeit zum Plazieren eines Liganden lag bei 1.5min auf einer herkömmlichen Workstation.

Das Wissen, daß Wasser eine entscheidende Rolle bei der Vermittlung von Protein-Ligand-Wechselwirkungen spielt, führte zur Entwicklung und Implementierung des Partikelkonzeptes (*particle concept*) (Rarey *et al.*, 1999b). Dabei werden vor der eigentlichen Plazierungen des Liganden in der Bindetasche zunächst sogenannte Phantompartikel in der Tasche plaziert, die mögliche Wasserpositionen modellieren. Werden bei der Plazierung des Liganden durch diese potentiellen Wassermoleküle (Phantompartikel) zusätzliche Wasserstoffbrücken vermittelt, wird unter Berücksichtigung der sterischen Hinderung der Partikel und der Geometrie der Wasserstoffbrückenbindungen die Position des Liganden optimiert und tatsächlich Wassermoleküle dort plaziert.

2.4 Bewertungsfunktionen

2.4.1 Bewertungsfunktion in FLEXX

Die Bewertungsfunktion (Scoringfunktion) in FLEXX wurde von Böhm ursprünglich für LUDI (SCORE1) (Böhm, 1994) (Böhm, 1998) entwickelt und in einer modifizierten Form in FLEXX (Rarey *et al.*, 1996a) implementiert (Gleichung 18).

Gleichung 18

$$\begin{aligned} \Delta G_{\text{binding}} = & \Delta G_0 + \Delta G_{\text{rot}} \cdot N_{\text{rot}} + \Delta G_{\text{hb}} \sum_{\text{h-bonds}} f(\Delta R, \Delta \alpha) + \Delta G_{\text{ionic}} \sum_{\text{ionic int.}} f(\Delta R, \Delta \alpha) \\ & + \Delta G_{\text{aromatic}} \sum_{\text{aromatic int.}} f(\Delta R, \Delta \alpha) + \Delta G_{\text{lipo}} \sum_{\text{lipo. cont.}} f^*(\Delta R) \end{aligned}$$

- $f(\Delta R, \Delta \alpha)$ ist eine Funktion, die starke Abweichungen von der idealen Wechselwirkungsgeometrie bestraft. Sie toleriert nur kleinere Abweichungen von der Ideal-Geometrie. Bei den Abständen der Wasserstoffbrückenbindungen (ΔR) werden 0.2\AA und bei dem Winkel ($\Delta \alpha$) 30° toleriert. Die erreichbare Genauigkeit in der Angabe solcher geometrischen Parameter liegt bei Proteinkristallstrukturen in dieser Größenordnung, und muß daher in der Funktion berücksichtigt werden.
- ΔG_0 ist ein Beitrag zur Bindungsenergie, der nicht direkt von spezifischen Wechselwirkungen mit dem Protein abhängt. Man kann ihn mit dem Teil der freien Bindungsenergie gleichsetzen, der aufgrund des Verlustes translatorischer und rotatorischer Entropie der den Komplex bildenden Reaktionspartner entsteht.
- ΔG_{rot} beschreibt den Verlust an Freier Bindungsenergie, der aufgrund des Einfrierens interner Freiheitsgrade des Liganden auftritt. N_{rot} ist die Anzahl der frei drehbaren Bindungen.
- ΔG_{hb} beschreibt den Beitrag idealer Wasserstoffbrücken-Bindungen.
- ΔG_{ion} steht für den Beitrag ungestörter ionischer Wechselwirkungen.

Diese Parameter wurden ursprünglich von Böhm an einem Datensatz von 45 Protein-Ligand-Komplexen kalibriert und in die Bewertungsfunktion übernommen ($\Delta G_0 = +5.4\text{kJ/mol}$, $\Delta G_{\text{rot}} = +1.4\text{kJ/mol}$, $\Delta G_{\text{hb}} = -4.7\text{kJ/mol}$, $\Delta G_{\text{ion}} = -8.3\text{kJ/mol}$, $\Delta G_{\text{lipo}} = -0.17\text{kJ/mol}$).

- $\Delta G_{aromatic} = -0.7 \text{ kJ/mol}$, ist ein neuer, SCORE2-spezifischer Parameter (Böhm, 1998), der den Beitrag von gerichteten Wechselwirkungen zwischen aromatischen Gruppen beschreibt.
- ΔG_{lipo} beschreibt den Beitrag lipophiler Wechselwirkungen als Summe über alle paarweisen Atom-Atom-Kontakte. Hierbei wird die Abweichung ΔR vom Ideal-Abstand der Atome, für den die Summe der um 0.6 \AA vergrößerten van-der-Waals-Radien angenommen wird, durch die Funktion $f^*(\Delta R)$ berücksichtigt (Gleichung 19).

Gleichung 19

$$f^*(\Delta R) = \begin{cases} 0 & \Delta R > 0.6 \text{ \AA} \\ 1 - \frac{\Delta R - 0.2}{0.4} & 0.2 \text{ \AA} < \Delta R \leq 0.6 \text{ \AA} \\ 1 - \frac{-\Delta R - 0.2}{0.4} & -0.2 \text{ \AA} < \Delta R \leq -0.2 \text{ \AA} \\ \frac{\Delta R + 0.6}{0.2} & R \leq -0.6 \text{ \AA} \end{cases}$$

2.4.2 DRUGSCORE

DRUGSCORE (Gohlke *et al.*, 2000) ist aus distanzabhängigen Atompaaipotentialen, sowie von der Lösungsmittel-zugänglichen Oberfläche abhängigen Einteilchenpotentialen abgeleitet. Letztere liefern den Lösungsmittel-Beitrag zur Gibbschen Freien Enthalpie bei der Bildung von Protein-Ligand-Komplexen. Als Datengrundlage diente hierbei die Rezeptor-Ligand-Datenbank RELIBASE (Hemm *et al.*, 1995; Hendlich, 1998) mit 6026 Protein-Ligand-Komplexen. Die distanzabhängigen Atompaa-Potentiale (zwischen Protein- und Ligandatom) werden mit Gleichung 20 berechnet:

Gleichung 20

$$\Delta W_{i,j}(r) = W_{i,j}(r) - W(r) = -\ln \frac{g_{i,j}(r)}{g(r)}$$

$g_{i,j}(r)$ ist eine normalisierte, radiale Paar-Verteilungsfunktion für Atome des Typs i und j , deren Abstand im Intervall r und $r + dr$ liegen. Die normalisierte, radiale Verteilungsfunktion $g(r)$ beschreibt zwei beliebige Atome im gleichen Abstandsintervall und entspricht somit einer Referenz, die alle nichtspezifischen Beiträge von Atompaaen

in einer Proteinumgebung enthält. Die statistische Präferenz ΔW_{ij} ergibt sich aus dem Vergleich zwischen den mittleren statistischen Präferenzen des Atompaares i, j (W_{ij}) und dem Referenzsystem (W). Der maximale Abstand von r wurde auf 6\AA beschränkt, so daß in dieser Gleichung Wechselwirkungen zwischen Atompaaaren ausgeschlossen werden, die durch ein verbrückendes Wassermolekül zustande kommen könnten.

Der Beitrag aus der Vergrabung der Lösungsmittel-zugänglichen Oberfläche (*Solvent Accessible Surface*, SAS) wird aus einer getrennten Betrachtung von Potentials für Ligand und Protein abgeleitet, die nur von einem Atomtyp abhängen (Gleichung 21):

Gleichung 21

$$\Delta W_i(SAS, SAS_0) = W_i(SAS) - W(SAS_0) = -\ln \frac{g_i(SAS)}{g_i(SAS_0)}$$

Darin ist g_i die normalisierte Verteilungsfunktion der Oberfläche eines Atoms i im vergrabenen Zustand (SAS) des Liganden in einem Protein-Ligand-Komplex. Diese Funktion wird mit der Oberfläche im solvatisierten Zustand (SAS_0) verglichen, wobei sich $g_i(SAS_0)$ im Gegensatz zu $g_{i,j}(r)$ aus Gleichung 21 nicht auf ein Atompaar i und j , sondern nur auf das Atom i bezieht. In $\Delta W_i(SAS, SAS_0)$ werden solche Prozesse nicht berücksichtigt, in denen polare Anteile des Liganden aus einem polaren Lösungsmittel in eine polare Proteinumgebung überführt werden.

Die Gesamt-Präferenz ΔW eines Protein-Ligand-Komplexes ergibt sich aus der Summe der Einzelbeträge ΔW_{ij} und $\Delta W_i(SAS, SAS_0)$:

Gleichung 22

$$\Delta W = \gamma \sum_{k_i} \sum_{l_j} \Delta W_{i,j}(r) + (1 - \gamma) \cdot \left[\sum_{k_i} \Delta W_i(SAS, SAS_0) + \sum_{l_i} \Delta W_j(SAS, SAS_0) \right]$$

Der Gewichtungsfaktor γ wurde empirisch auf 0.5 optimiert.

2.5 Methoden zur Analyse von Proteinbindetaschen

2.5.1 GRID

Eine Funktion, die anziehende und abstoßende Kräfte (Wechselwirkungsenergien) von zwei nichtbindenden Atomen A und B sehr gut beschreibt, ist das Lennard-Jones-(12,6)-Potential (Gleichung 23)(Goodford, 1985).

Gleichung 23

$$E_{ij} = \frac{A}{d^{12}} - \frac{B}{d^6}$$

Das Programm GRID verwendet u.a. dieses Potential innerhalb eines empirischen Kraftfeldes mit der Energiefunktion E_{xyz} , (Gleichung 24), um nichtbindende Wechselwirkungsenergien vorherzusagen, die zwischen Ligand und Protein auftreten. Hierfür werden sogenannte Sonden eingesetzt, die beispielsweise aus einem Aminostickstoffatom, einem Carbonylsauerstoffatom, einer Hydroxylgruppe, einer Methylgruppe oder einem Wassermolekül bestehen können. Mittlerweile stehen in GRID über 50 verschiedene Sonden zur Auswahl. Atomgruppen (z.B. OH, CH₃) werden, basierend auf dem erweiterten Atomansatz zusammengefaßt. Ein „erweitertes Atom“ ist eine auf einer Punktladung zentrierte Sphäre, bestehend aus einem Schweratom mit einer entsprechenden Anzahl an Wasserstoffatomen, die implizit durch eine Modifizierung des Lennard-Jones-Potentials und der elektrostatischen Parameter des Nichtwasserstoffatoms miteinbezogen werden.

Die Wechselwirkungsenergie E_{xyz} einer Sonde mit einem „erweiterten Proteinatom“ wird an bestimmten Gitterpunkten („grid points“) eines kubischen Gitters innerhalb der Bindetasche berechnet und anschließend auf festgelegten Energieniveau als 3-dimensionale Konturen (Wechselwirkungsfelder) in der Bindetasche visualisiert. E_{xyz} repräsentiert somit die Summe von paarweisen Wechselwirkungen zwischen einer Sonde und dem jeweiligen Proteinatom.

Gleichung 24

$$E_{xyz} = \sum E_{lj} + \sum E_{el} + \sum E_{hb}$$

Der Bereich in dem die (leicht) negative, anziehende, interatomare Wechselwirkungsenergie E_{lj} zwischen Ligand und Protein wirkt, liegt innerhalb der Abstände d' und d'' (Abbildung 12). Ist der Abstand zwischen Sonde und dem

wechselwirkenden Proteinatom größer als 8\AA (-0.01kcal/mol), wird für E_{ij} ein Wert von Null festgelegt.

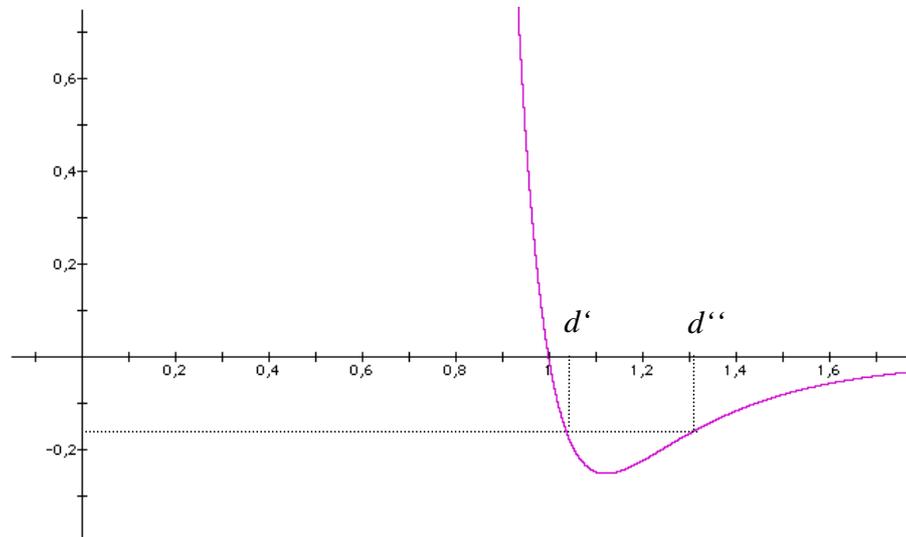


Abbildung 12 Verlauf des Lennard-Jones(12,6)-Potentials für die Wechselwirkungsenergie zwischen zwei nichtbindenden Atomen. Abzisse: Wechselwirkungsenergie E_{ij} . Ordinate: Interatomarer Abstand d . Leicht negative Werte von E_{ij} führen zu zwei alternativen Abständen d' und d'' die den Bereich der interatomarer Anziehung begrenzen.

E_{el} ist der elektrostatische Beitrag der empirischen Energiefunktion E_{xyz} . Auch bei diesem Potential werden paarweise Wechselwirkungen zwischen Sonde und „erweitertem Proteinatom“ evaluiert. Die Größe von E_{el} hängt jedoch empfindlich von der räumlichen Dielektrizität der Umgebung ab. Hopfinger (Hopfinger, 1973) schlägt deshalb die Berücksichtigung einer distanzabhängigen Dielektrizitätskonstanten vor. Die Funktion E_{el} modelliert anhand verschiedener homogener Phasen und einer nominalen Tiefe der Atome in der Proteinstruktur die Distanzabhängigkeit der Dielektrizität von umgebender Lösung und Protein.

Der Energiebeitrag der direktionalen Wasserstoffbrückenbindungen wird durch die Funktion E_{hb} beschrieben (Boobbyer *et al.*, 1989; Wade *et al.*, 1993; Wade & Goodford, 1993). Diese Energie setzt sich aus dem Produkt dreier Terme zusammen (Gleichung 25).

Gleichung 25

$$E_{hb} = E_r \times E_t \times E_p \quad 0 < E_t < 1 \quad \text{und} \quad 0 < E_p < 1$$

Der Wert von E_r hängt von dem Abstand r , der an der Wasserstoffbrückenbindung beteiligten Atome ab. Der Wert von E_t und E_p wird durch die Winkel t und p der an einer Wasserstoffbrückenbindung beteiligten Atome bestimmt. Diese Winkel beschreiben die relative Orientierung der Wasserstoffbrücke im Raum. E_{hb} ist weiterhin in der Lage, mehrere Positionen eines Wasserstoffatoms, z. B. einer Hydroxylgruppe einer Tyrosin-Seitenkette, zu berücksichtigen.

Mittels verschiedener Sonden kann so eine Analyse der Bindetasche durchgeführt werden. Die so erhaltenen Konturen lassen erkennen, wo sich günstige bzw. ungünstige Wechselwirkungsbereiche für einen potentiellen Inhibitor befinden bzw. wo die Ableitung eines Pharmakophors zur Datenbanksuche sinnvoll erscheint.

2.5.2 SUPERSTAR

ISOSTAR (Bruno *et al.*, 1997), eine Datenbank^a mit nichtbindenden Wechselwirkungen, enthält dreidimensionale Verteilungen („scatterplots“, Streumengen) bestimmter Wechselwirkungsgruppen um funktionelle Gruppen, z.B. die einer Sonde (Kontaktgruppe) um eine andere funktionelle Gruppe (Zentralgruppe). Diese „Scatterplots“ werden in dem Programm SUPERSTAR in Dichten transformiert. SUPERSTAR nutzt diese Dichten um mittels einer Sonde in Abhängigkeit von deren Wechselwirkungswahrscheinlichkeit, in der Bindetasche Wechselwirkungsfelder zu generieren. SUPERSTAR (VERDONK *ET AL.*, 1999) basiert auf einen Ansatz bei dem die nichtbindenden interatomaren Wechselwirkungen zwischen Ligand und Protein durch Wechselwirkungswahrscheinlichkeiten vorhergesagt werden. Diese Wahrscheinlichkeiten basieren wiederum auf den beobachteten Häufigkeiten dieser Wechselwirkungen bei experimentellen Kristallstrukturen und werden in Form dreidimensionaler Verteilungen („scatterplots“, Streumengen) beschrieben. Nach der Wahl einer Sonde (Kontaktgruppe) wird das zu analysierende Protein in entsprechende Zentralgruppen eingeteilt. Im Anschluß werden die Zentralgruppen aus ISOSTAR, mit den dazugehörigen „Scatterplots“, mit den Zentralgruppen des Proteins verglichen und überlagert. Die „Scatterplots“ werden dann zu normierten, den Wechselwirkungswahrscheinlichkeiten entsprechenden Dichten transformiert, wobei überlagernde Dichten vereinigt und als Wechselwirkungsfelder visualisiert werden.

Während bei dem Programm GRID mittels empirischer Kraftfeldfunktionen, die nichtbindenden Wechselwirkungsenergien abgeschätzt werden, wurden in SUPERSTAR kristallographische Daten, der CSD (*Cambridge Structural Database*) (Allen *et al.*, 1991) und der PDB (*Protein Data Bank*) (Bernstein *et al.*, 1977) analysiert, um die

^a Die Daten stammen aus den Datenbanken CSD (*Cambridge Structural Database*) (Allen *et al.*, 1991) und PDB (*Protein Data Bank*) (Bernstein *et al.* 1977).

nichtbindenden Wechselwirkungswahrscheinlichkeiten zu bestimmen und für die Vorhersage zu nutzen. Der Einbindung der CSD, die ausschließlich aus Kristallstrukturen kleiner organischer Molekülen besteht, begründet sich, wie folgt: durch die hohe kristallographische Auflösung der Strukturen und damit verbunden die Bestimmung von Wasserstoffatompositionen in den Strukturen ermöglichen die Berücksichtigung von Wasserstoffatomen bei der Konturierung von Wechselwirkungsfeldern. Besonders im Hinblick auf die Direktionalität der Wasserstoffbrückenbindung ist eine höhere Genauigkeit gegeben. Weiterhin ist durch die hohe strukturelle Diversität an Verbindungen die Ableitung einer Vielzahl an unterschiedlichen Sonden möglich.

In der aktuellen Version von SUPERSTAR stehen 23 Sonden zur Verfügung, um die Bindetasche eines Proteins zu analysieren. SUPERSTAR berücksichtigt, ähnlich wie GRID, die konformative Flexibilität der C-OH-Gruppen in den Seitenketten von Serinen, Threoninen, Tyrosinen und der C-NH₃⁺-Gruppen im Protein.

2.5.3 LUDI

Zum *De novo*-Design von Inhibitoren wurde das Programm LUDI (BÖHM, 1992A; BÖHM, 1992B) entwickelt. Nach einer Analyse der Bindetasche platziert der Algorithmus in LUDI kleine Moleküle bzw. Molekülfragmente aus einer Datenbank in den zuvor definierten Bereich der Proteinbindetasche. Bei der Platzierung werden Wasserstoffbrücken-Bindungen und lipophile Kontakte komplementär zu den Proteinatomen ausgebildet. Dazu werden regelbasierte Wechselwirkungszentren generiert, die aus statistischen Analysen von Kontaktgeometrien organischer Moleküle der CSD (Kapitel 2.5.2) abgeleitet wurden. LUDI klassifiziert die Proteinatome nach ihrem Atomtyp und der Konnektivität in folgende vier Kategorien: H-Donoren, H-Akzeptoren, aromatische und aliphatische Wechselwirkungszentren. Die Wechselwirkungszentren für Wasserstoffbrücken-Bindungen werden als Vektoren (Stäbchen) mit einer definierten Länge dargestellt. Diese Längen korrespondieren näherungsweise mit den experimentellen Bindungslängen der N-H/O-H bzw. C=O Bindung. Die Bereiche für hydrophobe Kontakte werden als Punkte im Raum dargestellt. Für jede funktionelle Gruppe des Proteins werden mehrere Wechselwirkungszentren generiert, da die Kontaktgeometrien aus Kristallpackungen organischer Moleküle eine breite Verteilung zeigen.

Die Moleküle werden der Datenbank entnommen und geometrisch (RMS-Superposition) auf den Wechselwirkungszentren platziert. Eine Bewertungsfunktion (Kapitel 2.4.1) bringt die eingepaßten Liganden in eine Rangfolge. Eine wichtige Einsatzmöglichkeit von LUDI besteht in der einfachen Generierung von

Wechselwirkungszentren in der Bindetasche, die als ersten Ansatz für das Aufstellen eines Pharmakophormodells dienen können.

2.6 Flexibilitätsanalyse

Bei der Analyse von Komplexstrukturen gilt ein besonderes Augenmerk der Flexibilität innerhalb der Bindetasche. Verursacht eine Ligand bei der Bindung eine Veränderung von Seitenkettenpositionen und somit eine strukturelle Anpassung der Bindetasche („induced fit“), so muß dies bei allen weiteren Analyse- und Filterschritten einer Datenbanksuche in Betracht gezogen werden, besonders bei der Verwendung von Dockingmethoden (Najmanovich *et al.*, 2000). Stehen Komplex- und Apostrukturen zu Verfügung, so können anhand einer Überlagerung (Superpositionierung) der Bindetaschen strukturelle Änderungen und Anpassungen auf einen Liganden erkannt werden. Das Datenbankprogramm RELIBASE+ (HENDLICH, 1998) erlaubt u.a. eine solche Überlagerung von Bindetaschen.

2.6.1 RELIBASE+

Die objektorientierte Datenbank RELIBASE+ ist ein System, das die komplette PDB (Bernstein *et al.*, 1977) enthält und speziell auf die Suche und Auswertung von Protein-Ligand-Wechselwirkungen ausgerichtet ist. Eine webbasierte^a, graphische Benutzeroberfläche erlaubt, strukturelle und physikochemische Daten zu extrahieren und auszuwerten. Die Datenbank kann nach speziellen oder ähnlichen Liganden und Ligandfragmenten, aber auch nach Wechselwirkungen, z.B. Ligand-Metall- oder Ligand-Wasser-Wechselwirkungen, durchsucht werden. Der FASTA-Algorithmus (Pearson & Lipman, 1988) in RELIBASE+ erlaubt die Suche nach homologen Proteinketten(stücken).

Eine dreidimensionale Überlagerung von Bindetaschen in RELIBASE+, anhand der die Bindetasche beschreibenden Aminosäuren, dient der strukturellen Analyse derselben. Durch die Überlagerung lassen sich z.B. in ihrer Position wiederholt auftretenden Wassermoleküle (konservierte Wassermoleküle), die Besetzung von Bindetaschen durch unterschiedliche Liganden, Mutationen am Protein oder Bewegungen innerhalb der Bindetasche erkennen.

^a <http://relibase.ccdc.cam.ac.uk>, <http://relibase.ebi.ca.uk>, <http://relibase.rutgers.edu>

Folgende Schritte haben sich bei der Überlagerung von Proteinstrukturen mit RELIBASE+ als geeignet erwiesen:

1. Auswahl *einer* geeigneten Komplexstruktur (Referenzstruktur), mit möglichst hoher Auflösung ohne Mutationen.
2. Suche nach sequenzähnlichen Strukturen (zwischen 99% und 100%) mit einer Auflösung kleiner als 2.5Å.
3. Überlagerung ausgewählter Strukturen anhand der die Bindetasche beschreibenden Aminosäuren (Auswahl der Aminosäuren - Radius von 6Å um den Liganden der Referenzstruktur).

2.7 Wasser

Gebundenes Wasser spielt eine wichtige Rolle bei der Funktion und der Struktur von Proteinen, sowie der Bildung von Protein-Ligand-Wechselwirkungen. Da alle biochemischen Reaktionen in wässrigem Milieu stattfinden, befinden sich auch in der Bindetasche Wassermoleküle, die durch die Ausbildung von Wasserstoffbrückennetzen und Wasserstoffbrückenbindungen zum Protein diese solvatisieren. Auch der Ligand ist von Wassermolekülen umgeben und muß diese bei der Diffusion in die Bindetasche abstreifen. So kommt es bei der Bindung eines Liganden nicht nur zur Neubildung von direkten Wechselwirkungen sondern auch zum Bruch von Wasserstoffbrücken. Bei der Bindung eines Liganden werden die Wassermoleküle innerhalb der Bindetasche ganz oder teilweise verdrängt, oder aber auch als „Übermittler“ von Wechselwirkungen zwischen Protein und Ligand genutzt (Poornima & Dean, 1995a). Die Problematik die sich bei der Analyse von gebundenen Wassermolekülen ergibt, wird von Levitt und Park (Levitt & Park, 1993) mit der Überschrift ihres Artikels „Water: now you see it, now you don't“ treffend zusammengefaßt. Wo sind die Wassermoleküle und wie lange verweilen sie dort und wie stark interagieren sie mit dem Protein? Untersuchungen von unterschiedlichen Proteinstrukturkomplexen mit NMR-Methoden haben gezeigt (Levitt & Park, 1993), daß Aufenthaltszeiten von 10^{-2} bis 10^{-8} Sekunden für vergrabene Wassermoleküle möglich sind. Dabei werden die gleichen Positionen besetzt, die auch bei hochaufgelösten Röntgenstrukturen dieser Komplexe gefunden wurden. Wassermoleküle die jedoch an der Oberfläche von Proteinen binden, haben nur eine Verweildauer von unter 500ps (Picosekunden, 10^{-12} s) (Otting *et al.*, 1991). Sowohl die Ladung als auch die Form der Oberfläche haben entscheidenden Einfluß auf die Bewegung von Wassermolekülen. So können polare Atome an Proteinseitenketten festere Wasserstoffbrückenbindungen zu Wassermolekülen aufbauen als unpolare und somit eine zeitlich begrenzte Fixierung der Wassermoleküle bewirken.

Eine wichtige kristallographische Kennzahl, die einen Hinweis auf konservierte, an einer bestimmten Stelle relativ gut populierte Wassermoleküle in experimentellen Proteinstrukturen geben kann, ist der Temperaturfaktor (B-Faktor, gemessen in \AA^2) (Frey, 1993).

Mittels Überlagerung mehrerer Komplexstrukturen (Kapitel 2.6.1) können ebenfalls – zumindest in der betrachteten Reihe – konservierte Wassermoleküle in Bindetaschen erkannt werden. Besonders deutlich wird die Konservierung von Wasser, wenn verschiedene Kristallformen eines Proteins zur Verfügung stehen und weiterhin

dieselben Positionen besetzt sind. Die Anzahl polarer Proteinatome innerhalb eines Radius von 3.5Å-4.0Å um das Sauerstoffatom des Wassers geben einen zusätzlichen Hinweis auf eine mögliche Konservierung der Wassermoleküle (Poornima & Dean, 1995b).

2.7.1 Moloc und MAB

MAB (Gerber & Müller, 1995), ein speziell für die Berechnung von Wasserstoffbrücken parametrisiertes und optimiertes Kraftfeld, wurde in dem Programm MOLOC^a implementiert. Da besonders bei der Betrachtung von Wassermolekülen (Kapitel 2.7) die Wasserstoffbrücken eine maßgebliche Wechselwirkung darstellen, wurde in der vorliegenden Arbeit dieses Kraftfeld zur Untersuchung von möglichen Wasserstoffbrückennetzen innerhalb der Proteinbindetasche eingesetzt.

Die Energie E des Kraftfeldes MAB setzt sich aus insgesamt sieben Termen zusammen (Gleichung 26).

Gleichung 26

$$E = E_b + E_v + E_\tau + E_p + E_{I4} + E_{In} + E_{hb}$$

Die ersten vier Terme repräsentieren die Valenzenergie, unterteilt in die Energien E_b für die Bindungsstreckung, E_v für die Bindungswinkeldeformation, E_τ für Torsionswinkeländerungen und E_p für die pyramidale Deformierung, sogenannte „out-of-plane“-Schwingungen, eine Auslenkung von Atomen aus einer planaren durch Π -Elektronen bestimmten Molekülbaustein. Die nichtbindenden Wechselwirkungen bestehen aus den Dispersionswechselwirkungsenergien E_{I4} und E_{In} und der Wasserstoffbrückenbindungsenergie E_{hb} .

Der Term E_{hb} , der die Wasserstoffbrückenbindungen beschreibt, unterscheidet sich von den in konventionellen Kraftfeldern verwendeten Termen. Besondere Charakteristika von MAB sind das strikte Festhalten an dem „vereinigten“ Atom („united-atom“) (Kapitel 2.5.1), die Einbindung von Direktionalitäten bei Wasserstoffbrückenbindungsgeometrien und die Optimierung von konsistenten Wasserstoffbrückenbindungsmustern.

^a Zur Verfügung gestellt von F.Hoffmann-La Roche AG, Basel, Schweiz.

2.8 Datenbanken

Datenbanken, die im Rahmen einer computergestützten Suche zum Einsatz kommen, müssen zunächst entsprechend den Anforderungen des jeweiligen Suchprogramms konvertiert und modifiziert werden. Dies beinhaltet z.B., daß für einige Programme, Verbindungen, die zunächst als Salze abgespeichert wurden, ohne ihre „kleineren“ Gegenionen zur Verfügung stehen müssen. Die 3D-Konformation der Moleküle, wie auch ihre Protonierung ist für einige Programme ebenso erforderlich, wie die Berechnung der Partialladungen.

Zur Generierung der im nächsten Kapitel beschriebenen Datenbanken wurde für die Protonierung und Erzeugung der 3D-Konformationen das Programm CORINA (Sadowski, 1997) eingesetzt. Die Partialladungen wurden als GASTEIGER-Ladungen (Gasteiger & Marsili, 1980) mit dem Programm SYBYL berechnet. Die Konvertierung der Datenbanken wurden mit PERL-SCRIPTEN und den unter UNITY bereitstehenden Konvertierungsprogrammen^a durchgeführt.

2.8.1 MAYBRIDGE

Die Molekül-Datenbank MAYBRIDGE (Maybridge Chemical Company Ltd., England) umfaßt in der hier verwendeten Version 61.186 Einträge. Die bei virtuellen Datenbanksuchen erhaltenen Treffer aus dieser Datenbank können anhand ihrer Kennung identifiziert und bei der Firma ChemPur (ChemPur Feinchemikalien GmbH, Deutschland) in Substanz erworben werden. Die Produktbeschreibung der MAYBRIDGE-Datenbank garantiert für den größten Teil ihrer Verbindungen eine Reinheit von >97% bei einer Verfügbarkeit von 99%. Weiterhin wird darauf hingewiesen, daß die Strukturen durch Massenspektroskopie und NMR überprüft sind, sowie für einen bestimmten Teil (ca. 41.000 Einträge, HTS-Screening) der Verbindungen, eine Optimierung hinsichtlich der Lipinski-Regeln (Kapitel 1.5.1) erfolgt ist. Die Konvertierung und Bereitstellung der Datenbank für die anderen Programme erfolgte mit den im Kapitel 2.8 beschriebenen Verfahren.

^a dbtranslate, dbexport, dbimport

2.8.2 LEADQUEST

Die Datenbank LEADQUEST der Firma Tripos (Tripos, Inc. St.Louis, USA) ist in drei Sub-Datenbanken (Volume 1, 2 & 3) unterteilt. Die Unterteilung resultiert aus dem ständigen Zuwachs an weiteren neuen Verbindungen. Im Folgenden wird jedoch nur von einer LEADQUEST-Datenbank gesprochen, die alle drei Sub-Datenbanken enthält und zusammengenommen 37.841 Strukturen beinhaltet. Analog zu der MAYBRIDGE-Datenbank sind auch die Strukturen in der LEADQUEST-Datenbank gekennzeichnet und werden durch die Firma Tripos in Substanz bereitgestellt.

Die Produktbeschreibung von LEADQUEST garantiert, daß sämtliche Verbindungen eine Reinheit >85% aufweisen (bestimmt nach analytischer HPLC (HP1100-System) mit universellem Wasser/Acetonitril-Gradienten mit UV-Detektion bei 254 nm). Ebenso wird eine hohe strukturelle Diversität (Patterson *et al.*, 1996) und eine Optimierung hinsichtlich der Lipinski-Regeln (Lipinski *et al.*, 1997) vom Hersteller angegeben.

3 Ergebnisse und Diskussion

Im Folgenden werden die erhaltenen Resultate gleichzeitig diskutiert, die Diskussion der Ergebnisse spiegelt so die Überlegungen, Probleme und deren Lösungen bei der Entwicklung der einzelnen Suchschritte wider. Ferner sei vorangestellt, daß alle Rechnungen auf einer Silicon Graphics O2 (R10.000) und Octane (R10.000) Workstation durchgeführt wurden. Die angegebenen Rechenzeiten beziehen sich auf diese Computer.

3.1 Virtuelles Screening

Die „*in silico*“ Datenbanksuche nach Leitstrukturen (virtuelles Screening) stützt sich auf den Einsatz der in Kapitel 2 beschriebenen Methoden. In den folgenden Kapiteln werden die einzelnen einschränkenden Kriterien (Filter) und deren Ergebnisse im Detail diskutiert.

Als grober Filter wurden zunächst die Verbindungen anhand der Lipinski-Regeln (Kapitel 1.5.1) durchmustert. Trafen zwei der vier Regeln zu, so wurde die Verbindung selektiert.

Der erste Filterschritt nach dieser Vorauswahl folgt zunächst dem Konzept, allein Informationen für die computergestützte Datenbanksuche zu verwenden, die sich aus den Eigenschaften bekannter Inhibitoren ablesen lassen (z.B. deren Konnektivität, Art der Zink-bindenden Gruppe usw.) (Kapitel 1.4.2). Dieser Filterschritt benötigt zunächst noch keine Informationen über z.B. die Verteilung von Wassermolekülen in der Bindetasche oder die Protonierung des Liganden. Alle weiteren, darauf aufbauenden Suchen sind strukturbasiert, setzen also die Kenntnis und Analyse der Bindetasche voraus. In Abbildung 13 ist schematisch der Ablauf des im Rahmen dieser Arbeit entwickelten computergestützten Screenings dargestellt.

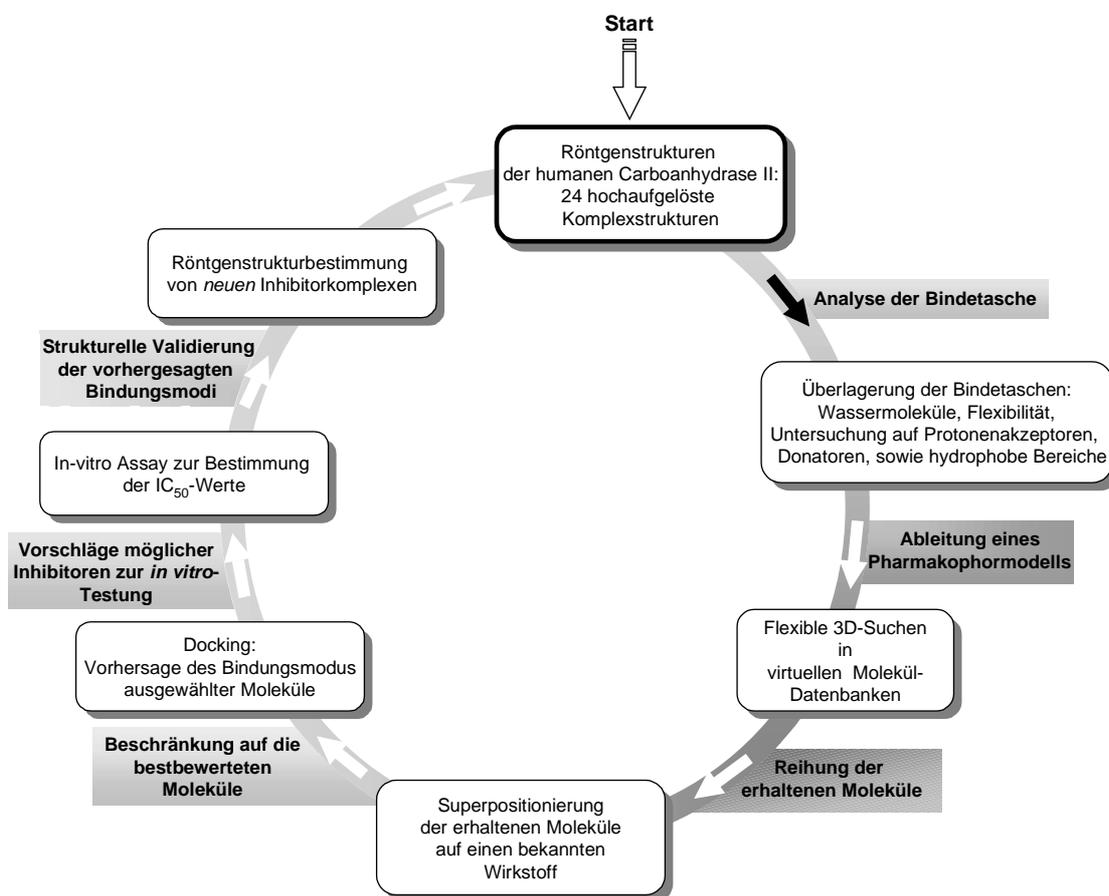


Abbildung 13 Flußdiagramm des virtuellen Screening-Zyklus.

3.1.1 Testdatensatz

Ein Testdatensatz, zusammengestellt aus 35 literaturbekannten HCAII-Inhibitoren (Tabelle 2) hatte die Funktion, bei jedem Filterschritt zu überprüfen, ob die Strukturen des Testdatensatzes als Treffer wiedergefunden wurden und gleichzeitig eine Bewertung im vorderen Bereich der selektierten Verbindungen erfuhren. Eine gezielte Optimierung der Filterkriterien, speziell bezogen auf diesen Testdatensatz, wurde nur bedingt vorgenommen, da in allen Filterschritten vermieden werden sollte, daß neue, von dem Testdatensatz abweichende Strukturen direkt ausgemustert wurden.

Bei der Erstellung des Testdatensatzes wurden 13 Inhibitoren gewählt, deren Bindungsmodus bereits experimentell bestimmt wurde und die eine hohe Bindungsaffinität aufweisen (siehe Eintrag Tabelle 2 in PDB-Code). Weitere 22 hochaffine Inhibitoren ($IC_{50}/K_i/K_d$ 40nM–1.2nM) wurden hinzugenommen, um eine strukturelle Diversität im Rahmen der bekannten Inhibitoren zu gewährleisten. Wie schon in Kapitel 1.4.4 beschrieben, ist allen publizierten Inhibitoren eine sulfonamidische "Ankergruppe" zur Koordination an das katalytische Zink gemein. So haben auch fast alle Inhibitoren des Testdatensatzes einen sogenannten sulfonamidischen "Anker". Ausnahmen stellen zwei Hydroxamate (Kapitel 1.4.6) dar, deren Affinitäten im mikromolaren Bereich liegen. Dennoch wurden sie dem Testdatensatz zugefügt, um diese Ankergruppe ebenfalls zu berücksichtigen.

Einige Analysen wurden durchgeführt, um einen Überblick über die vorhandene Diversität des Testdatensatzes zu erhalten. So ist das Molekulargewicht der verwendeten Inhibitoren im Bereich von 75D bis 478D, der berechnete MLogP (Moriguchi *et al.*, 1994; Moriguchi *et al.*, 1992) variiert von -1.46 bis 1.90. Als Maß für die Flexibilität wurde die Anzahl der drehbaren Bindungen bestimmt, die zwischen 2 und 16 lag. Die Anzahl an H-Brückenakzeptoren pro Verbindung variiert zwischen 2 und 7, die der H-Brückendonoren zwischen 1 und 4. Die Wertebereiche der einzelnen Parameter liegen in den von Lipinski *et al.* vorgeschlagenen Grenzen für potentielle Wirkstoffe (Kapitel 1.5.1).

Ein weiteres Maß für die Diversität innerhalb eines Datensatzes, im Sinne gleicher biologischer Aktivität, ist die Ähnlichkeit der verwendeten Strukturen bezogen auf eine Referenzstruktur. Mit Hilfe des bereits in Kapitel 1.5.2 beschriebenen Tanimoto-Koeffizient (Similarity Index)^a, der einen fließenden Übergang von „ähnlichem“ bishin zum „unähnlichem“ Molekül in einer Maßzahl zu quantifiziert, wurde hierbei

^a Tanimotokoeffizient (0.0-1.0) wird in Unity als Similarity Index (SimIndex) von 0 bis 100 angegeben.

beabsichtigt, die Ähnlichkeit^a zu einer Referenzstruktur zu berechnen. Als Referenzstrukturen wurden jeweils Dorzolamid **5** bzw. Acetazolamid **1** gewählt, zwei strukturell unterschiedliche Hemmstoffe, die als Wirkstoffe mit hoher Affinität beschrieben worden sind. In Abbildung 14 sind die Verteilungen der von UNITY berechneten SimIndizes (Kapitel 2.3.1) dargestellt.

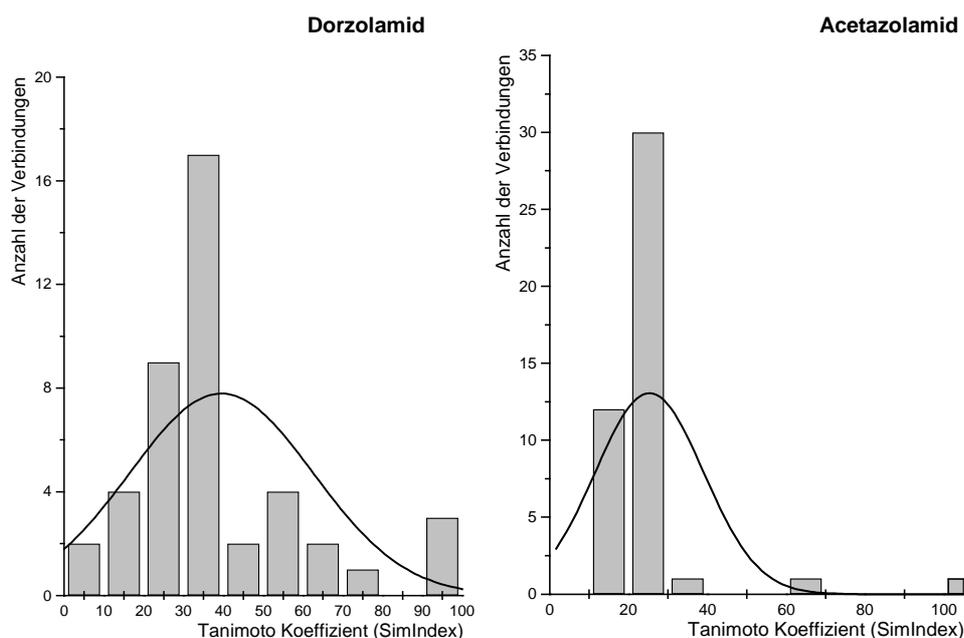
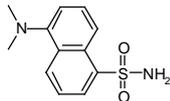
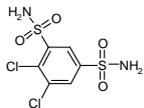
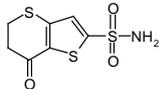
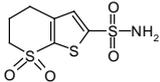
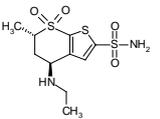
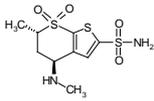
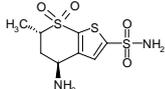
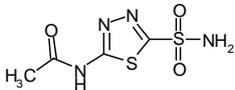
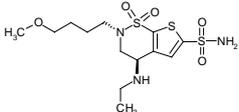


Abbildung 14 Normalverteilung der Ähnlichkeitsindizes des Testdatensatzes von Dorzolamid **5** und Acetazolamid **1**.

Die Normalverteilung für Dorzolamid **5** als Referenz zeigt (in Abbildung 14 als Kurve dargestellt), daß der überwiegende Teil der Strukturen einen SimIndex^a zwischen 40% und 50% aufweist, bei Acetazolamid **1** liegt der Bereich zwischen 10% und 30%. Legt man den in Kapitel 1.5.2 beschriebenen Tanimoto-Koeffizienten von 0.85 (vergleichbarer SimIndex bei 85%) als Maß für die Auswertung dieser Ergebnisse zu Grunde, so zeigen die Verteilungen eine deutliche strukturelle Abweichung zu den etablierten Wirkstoffen Dorzolamid und Acetazolamid. Dies ist eine bewußt gewählte Streuung im Sinne der strukturellen Diversität innerhalb des Testdatensatzes, um bei der Bewertung der einzelnen Suchschritte eine möglichst große Vielfalt an neuen Verbindungen herausfiltern zu können.

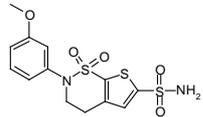
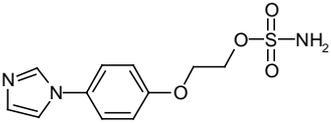
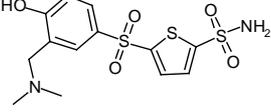
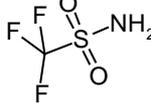
^a Ferguson *et al.* (1996) und R. Taylor (1995) sprechen von einem Tanimoto-Koeffizienten von 0.8 bis 0.85, der bei der Berechnung als Grenze zum Zusammenfassen von „ähnlichen“ Molekülen anzusehen ist.

Tabelle 2 Übersicht der im Testdatensatz verwendeten 35 Inhibitoren.

Verbindung	Name	PDB	K_i / K_d / IC_{50}	SimIndex Dorzolamid Acetazolamid	MlogP	Zitat
	Dansylamid MNS	1okl	$K_i = 0.93 \mu\text{M}$	22.2 17.4	1.60	(Nair <i>et al.</i> , 1996)
	Dichlorophenamid _DCPA	–	$IC_{50} = 40.0 \text{ nM}$	21.0 19.5	0.19	(Graham <i>et al.</i> , 1989).
	_VTS	–	$K_i = 1.15 \text{ nM}$ $IC_{50} = 3.5 \text{ nM}$	45.6 21.4	0.11	(Ponticello <i>et al.</i> , 1987)
	_STS	–	$K_i = 3.3 \text{ nM}$ $IC_{50} = 4.5 \text{ nM}$	77.4 22.3	-1.02	(Ponticello <i>et al.</i> , 1987).
	Dorzolamid Trusopt™ MK-507 ETS	1cil	$K_i = 0.372 \text{ nM}$ ($IC_{50} = 0.18 \text{ nM}$ Sugrue, 1997, Drugs of today)	100 25.2	-0.84	(Hunt <i>et al.</i> , 1994) (Smith <i>et al.</i> , 1994)
	MTS	1cim	$K_i = 1.88 \text{ nM}$	98.9 25.0	-1.14	(Smith <i>et al.</i> , 1994)
	PTS	1cin	$K_i = 1.52 \text{ nM}$	93.8 24.4	-1.46	(Smith <i>et al.</i> , 1994)
	Diamox Acetazolamid AZM	1yda	$K_i = 6.0 \text{ nM}$ ($K_i = 22.0 \text{ nM}$ (Baldwin <i>et al.</i> , 1989)) ($IC_{50} = 3.4 \text{ nM}$ Sugrue, 1997, Drugs of today)	25.2 100.0	-1.58	(Maren, 1987)
	Brinzolamid Azopt AL-4862 _Azopt	1a42	$IC_{50} = 3.2 \text{ nM}$ ($K_d = 0.13 \text{ nM}$ Boriack-Sjodin, 1998 Prot. Science)	63.2 26.7	-0.96	(Stams <i>et al.</i> , 1998)

Verbindung	Name	PDB	$K_i / K_d / IC_{50}$	SimIndex Dorzolamid Acetazolamid	MlogP	Zitat
	No. 55 („besten“ Inhibitor dieser Serie) _TIO55	-	$K_i = 1.58 \text{ nM}$ $IC_{50} = 2.8 \text{ nM}$	39.3 27.4	-0.22	(Prugh <i>et al.</i> , 1991)
	No. 51 _TIO51	-	$K_i = 1.1 \text{ nM}$ $IC_{50} = 3.0 \text{ nM}$	39.4 26.9	0.19	(Prugh <i>et al.</i> , 1991)
	No. 52 _TIO52	-	$K_i = 0.44 \text{ nM}$ $IC_{50} = 2.6 \text{ nM}$	40.3 26.8	0.98	(Prugh <i>et al.</i> , 1991)
	EG ₃ PheNH ₃ ⁺ EG3	1cny	$K_d = 14.0 \text{ nM}$	36.7 24.3	0.07	(Boriack <i>et al.</i> , 1995)
	EG ₃ GlyNH ₃ ⁺ EG1	1cnw	$K_d = 19.0 \text{ nM}$	30.6 26.5	-1.33	(Boriack <i>et al.</i> , 1995)
	EG ₃ NH ₃ ⁺ EG2	1cnx	$K_d = 43.0 \text{ nM}$	30.8 26.7	-0.70	(Boriack <i>et al.</i> , 1995)
	(MK-927) MK-417 (S) _MK-927	-	$K_i = 0.635 \text{ nM}$ $IC_{50} = 0.54 \text{ nM}$	94.5 26.2	-0.84	(Baldwin <i>et al.</i> , 1989)
	Benzothiazol No.39 _BTZ39	-	$IC_{50} = 1.2 \text{ nM}$	30.0 28.7	-0.10	(Woltersdo rf <i>et al.</i> , 1989)
	Benzothiazol No.49 _BTZ49	-	$IC_{50} = 1.2 \text{ nM}$	29.0 30.3	0.22	(Woltersdo rf <i>et al.</i> , 1989)
	Benzothiophen No.25 _BTZ25	-	$IC_{50} = 2.6 \text{ nM}$	38.3 22.8	1.69	(Graham <i>et al.</i> , 1989)
	BFU	-	$IC{50} = 3.0 \text{ nM}$	28.3 18.0	0.92	(Graham <i>et al.</i> , 1990)

Verbindung	Name	PDB	K _i / K _d / IC ₅₀	SimIndex Dorzolamid Acetazolamid	MlogP	Zitat
	Methazolamid MZA _MZA	-	IC ₅₀ = 21.0 nM	23.7 23.4	-1.70	(Graham <i>et al.</i> , 1989)
	_SSF	-	IC ₅₀ = 1.5 nM	29.2 16.8	1.60	(Shepard <i>et al.</i> , 1991)
	_SSS	-	IC ₅₀ = 2.3 nM	56.3 23.7	-1.46	(Shepard <i>et al.</i> , 1991)
	RWJ-37947 _RWJ	-	IC ₅₀ = 21-130 nM	18.2 14.4	1.90	(Maryanoff <i>et al.</i> , 1998)
	STB	1okm	-	33.9 26.5	0.52	(Elbaum <i>et al.</i> , 1996)
	SAB555 SAB	1okn	-	34.3 26.0	0.24	(Elbaum <i>et al.</i> , 1996)
	Thienofuran 11e _TFU	-	K _i = 1.24 nM IC ₅₀ = 5.6 nM	35.0 20.8	-0.55	(Hartmann, 1998)
	_SFS	-	IC ₅₀ = 3.0 nM	23.4 18.2	0.10	(Scholz <i>et al.</i> , 1993)
	HAE555 _HAE	1am6	IC ₅₀ = 47 μM	6.2 13.2	-0.81	(Scolnick <i>et al.</i> , 1997)
	_HYF	-	IC ₅₀ = 3.8 μM	6.8 11.6	-0.06	(Scolnick <i>et al.</i> , 1997)
	_SCO	-	IC ₅₀ = 7.0 nM	23.8 20.9	0.33	(Scozzafava & Supuran, 1998)

Verbindung	Name	PDB	$K_i / K_d / IC_{50}$	SimIndex Dorzolamid Acetazolamid	MlogP	Zitat
	AI-7182 _AL-7182	1bnn	$K_d = 0.10$ nM	51.4 24.2	0.35	(Boriack-Sjodin <i>et al.</i> , 1998)
	AHR-16329 _AHR	-	$K_i = 7.0$ nM	19.3 16.6	0.37	(Brechue & Maren, 1993)
	L-662,583 _TPSA	-	$IC_{50} = 0.7$ nM	53.0 26.8	-0.45	(Sugrue <i>et al.</i> , 1990)
	_TFM	-	$K_i = 2.0$ nM	10.9 14.8	-1.05	(Maren & Conroy, 1993)

3.1.2 Optimierung der Datenbanken

Um Verbindungen auszuschließen, die als Salze in den Datenbanken vorliegen, aber auch um die in Kapitel 1.5.1 beschriebenen Lipinski-Regeln zu berücksichtigen, wurde eine Vorauswahl der Verbindungen vorgenommen. Durch eine Filterfunktion (Angabe bestimmter Grenzwerte, z.B. für Molekülmasse, Chiralität, Anzahl der Ringe, Metallatome) konnten Verbindungen mit dem Programm SELECTOR (TRIPOS, 1999) bzw. mit SPL- und PERL-SCRIPTEN^a selektiert werden, die diesem Kriterium genügen.

Ausgehend von insgesamt 98.997 Verbindungen aus den Datenbanken LEADQUEST und MAYBRIDGE wurde so auf eine Gesamtzahl von 98.850 Strukturen reduziert. Die Differenz von nur 147 bestätigt, daß die verwendeten Datenbanken bereits nach diesen Kriterien von den Vertreibern (Tripos und Maybridge) voroptimiert wurden.

3.1.2.1 Erster Filterschritt: Zink-bindende Ankergruppen

Bei der ersten zielgerichteten Suche nach potentiellen Inhibitoren wurde nach solchen Verbindungen selektiert, die eine der folgenden terminalen funktionellen Gruppen (Ankergruppen) tragen. Zu den gesuchten Ankergruppen zählten: Hydroxamate, Thiadiazol-thiocarbonyle, Sulfondiimide, Sulfonamide, Phosphate, Phosphoramide, Amide und Carbonsäuren. Es handelt sich ausschließlich um funktionelle Gruppen, die in der Literatur bereits als Zink-bindende Gruppen beschrieben worden sind (Babine & Bender, 1997). Zur Datenauswahl wurde das in Kapitel 2.3.1 beschriebene 2D-Ähnlichkeitssuchverfahren eingesetzt. Es bietet die Möglichkeit, eine große Zahl an Strukturen schnell zu durchmustern. Unter Verwendung der *Sybyl Line Notation* (SLN)^b und der „List Markushes^c“-Methode^d wurden die funktionellen Gruppen, wie in Tabelle 3 beschrieben, als Anfrage in UNITY (TRIPOS, 2000B) formuliert.

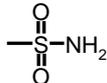
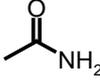
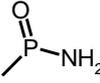
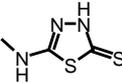
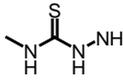
^a Mit freundlicher Unterstützung von L. Naerum und O. Krämer

^b Für weitere Erläuterungen siehe Tripos SLN Manual.

^c *Markush*-Verbindungen sind definiert als Molekülfragmente die R-Gruppen enthalten (Markush, 1924).

^d Unity User Guide Version 4.1.2 May 2000 , Kap. 2.1.6 List Markushes.

Tabelle 3 *Verwendete SLN-Codes zur 2D-Topologiesuche nach Zink-bindenden "Ankergruppen" mit dem Programm UNITY.*

Ankergruppe	SLN-Code
	C(=O)NH(OH)
	N(OH)C(=O)H
	C(=O)OH
	S(=O)(=O)NH2
	C(=O)NH2
	P(=O)NH2
	P(=O)(OH)OH
	N[1]NHC(SC=@1NHC)=S
	NH2NHC(N)=S
	S(N)(N)

Mit geringem Rechenaufwand (30 Minuten) wurden so die Datenbanken LEADQUEST und MAYBRIDGE von den ursprünglichen 98.850 Strukturen auf 5.904 reduziert. Dieser verbleibende Datensatz diente als Ausgangspunkt für weitere nach schärferen und anspruchsvolleren Kriterien festgelegten Suchen. Der Testdatensatz passierte diesen Filterschritt vollständig.

3.1.2.2 Erster Filterschritt: RIGFIT

Eine Alternative zu der im letzten Kapitel beschriebenen Topologiesuche nach vorgegebenen funktionellen Gruppen besteht in einer fragmentbasierten 3D-Ähnlichkeitssuche. Vorteil ist hier, daß keine Beschränkung auf bekannte funktionelle Gruppen zwingend vorgegeben wird. Prinzipiell könnten auch neue Gruppen entdeckt werden, die nach definierten Ähnlichkeitsbedingungen Verwandtschaft mit der Referenz aufweisen. Das Programm RIGFIT wurde (Kapitel 2.3.2) in das Programm FLEXS (Lemmen *et al.*, 1999) implementiert. Dieses Programm ist im *database-screening*-Modus in der Lage, basierend auf den physiko-chemischen Eigenschaften eines Referenzfragmentes, sehr schnell Verbindungen einer Datenbank zu filtern, die Fragmente ähnlicher physiko-chemischer Eigenschaften besitzen. Anschließend werden die gefundenen Strukturen, die solche Fragmente aufweisen, nach ihrer Übereinstimmung bewertet.

Da in der Literatur vorwiegend Sulfonamide als Inhibitoren der humanen CAII beschrieben worden sind (Kapitel 1.4.2), lag die Wahl der sulfonamidischen Ankergruppe als Referenzfragment nahe. Die Datenbanken LEADQUEST und MAYBRIDGE wurden nach Verbindungen mit Gruppen physiko-chemischer Ähnlichkeit mit einem Sulfonamidanker durchsucht. Die Dauer der Rechnungen lag bei ca. 5 Stunden. Bei diesem Verfahren läßt sich die Anzahl der möglichen Treffer nur durch die Festlegung eines vorgebbaren Grenzwertes des Ähnlichkeitsmaßes limitieren. Anhand des hinzugenommen Testdatensatzes sollte ermittelt werden, in welchem Wertebereich eine Anreicherung (Kapital 1.5.1) stattfindet.

Da man davon ausgeht, daß Sulfonamide durch einen sulfonamidischen Anker in der Regel hoch bewertet werden, schien der Testdatensatz bei diesem Suchschritt nur bedingt geeignet zu sein. Zusätzlich wurden deshalb die bereits im vorigen Kapitel beschriebenen Ankergruppen zur Definition der Obergrenze für das maximal zu berücksichtigende Ähnlichkeitsmaß herangezogen. Die Auswertung der Suche zeigt jedoch, daß eine eindeutige Anreicherung der Testdatensatzverbindungen mit sulfonamidischen Anker nicht wie angenommen stattfand. Wie der Verlauf der Kurve des in Abbildung 15 dargestellten Graphen anschaulich demonstriert, beginnt ein Auffinden der Testdatensatzverbindungen erst nach ca. 15% der durchsuchten Datenbankverbindungen.

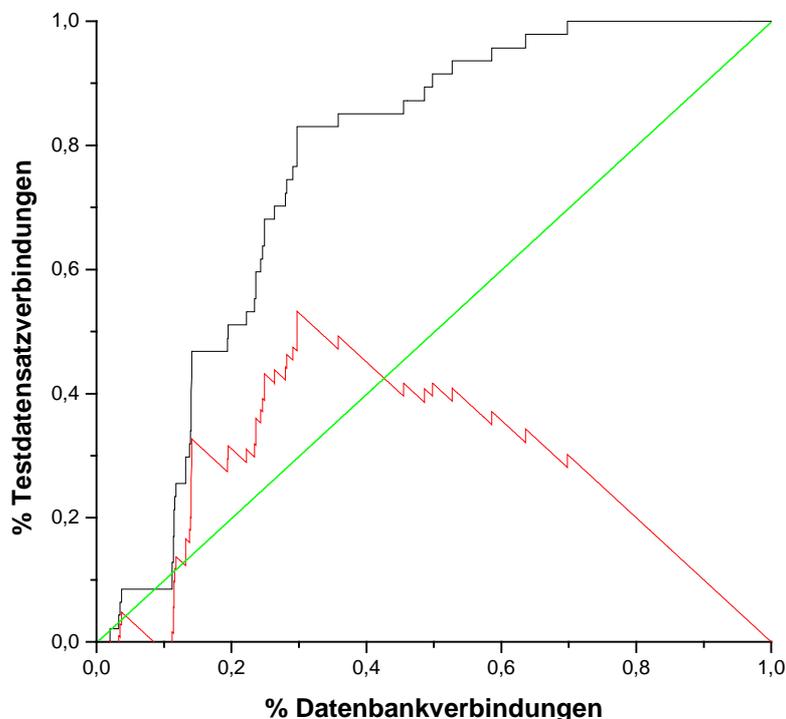


Abbildung 15 *Der Prozentsatz an angereicherten Verbindungen des Testdatensatzes korreliert mit dem Prozentsatz an durchgemusterten Datenbankverbindungen ergibt die schwarze Kurve. Die Diagonale (grün) entspricht einer zufälligen Auswahl an Testdatensatzverbindungen und die rote Kurve stellt die **effektive** Anreicherungsrate dar. Diese ergibt sich wiederum aus der Differenz von zufälliger Auswahl und einer gezielten Auswahl mit RIGFIT.*

Eine mögliche Erklärung für dieses Ergebnis ist in Abbildung 16 zu sehen. Hier wurde die Connollyoberfläche zusammen mit dem elektrostatischen Potential (EP)^a, das auf einem von Gasteiger (Gasteiger & Marsili, 1980) beschriebenen Verfahren zu Berechnung von atomaren Punktladungen beruht, von zwei Verbindungen und dem sulfonamidischen Suchfragment berechnet und dargestellt.

$$^a EP(i) = \sum_{j=1}^N \frac{q_j}{r_{ij}}$$

EP(i) = Potential am Oberflächenpunkt *i*

q_j = Partialladung von Atom *j*

r_{ij} = Abstand zwischen Punkt *i* und Atom *j*

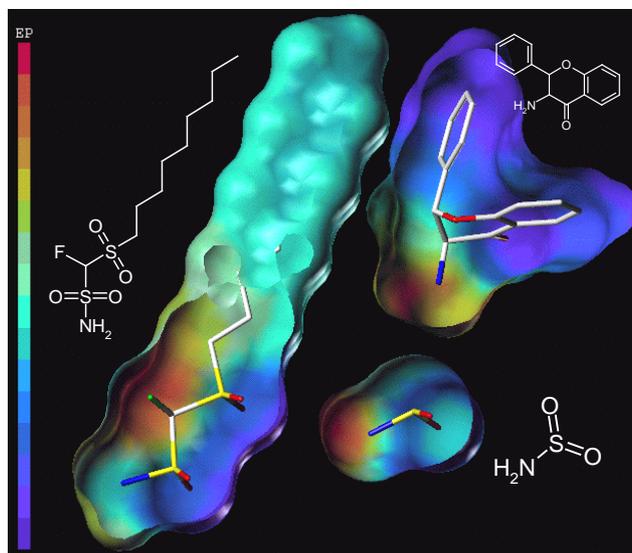
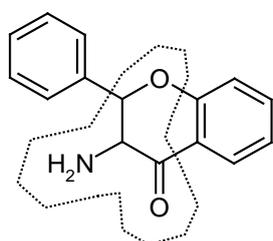


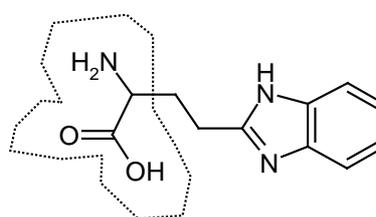
Abbildung 16 Vergleich der durch RIGFIT selektierten „besten“ Verbindung (Pyronderivat) und der am „schlechtesten“ bewerteten Testdatensatzverbindung **_SFS** (Sulfonamidfluorsulfonderivat) mit dem sulfonamidischen Suchfragment. Dargestellt ist jeweils die Connollyoberfläche farbkodiert mit dem elektrostatischen Potential der zugrundeliegenden Verbindung. Die Farbskala entspricht dem Verlauf des elektrostatischen Potentials (EP), von rot überwiegend negativ bis hin zu blau überwiegend positiv.

Das Pyronderivat ist die nach dem Ähnlichkeitsmaß in RIGFIT als am ähnlichsten definierte Verbindung. Das Sulfonamidfluorderivat stammt aus dem Testdatensatz (Kapitel 3.1.1) und wurde von den Testdatensatzverbindungen am „wenigsten ähnlich“ bewertet. Ein visueller Vergleich der Oberflächen, die entsprechend der errechneten elektrostatischen Potentiale angefärbt wurden, zeigt deutlich, daß das Sulfonamidfragment mit Teilbereichen des Pyronderivates gut übereinstimmt. Bei dem Sulfonamidfluorderivat hingegen ist ein Vergleich nur eingeschränkt möglich. Ein Grund für das erzielte Ergebnis könnten die zweite Sulfongruppe und das Fluoratom dieser Verbindung sein, die gegebenenfalls additiv eine Ladungsverschiebung hervorrufen. Sicherlich stößt ein heuristisches Verfahren, wie die hier verwendete Gasteigermethode zur Ladungsberechnung, für ein solches Fragment an ihre Grenzen, so daß die verwendeten Ladungen mit entsprechender Achtsamkeit zu verwenden sind. In Folge müssen die Vergleiche im Hinblick auf physiko-chemische Ähnlichkeit mit einem „normalen“ (gebundenen) Sulfonamidfragment kritisch betrachtet werden. Dennoch wurde aus Rechenzeitgründen das Ladungsberechnungsverfahren von Gasteiger auf dieser Filterstufe angewandt. Kritisch zu sehen ist auch, daß die

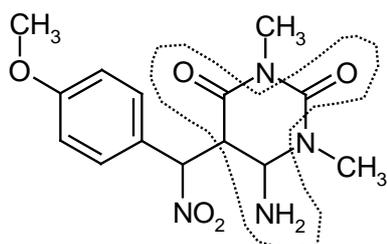
Beschreibung der physiko-chemischen Eigenschaften bei RIGFIT (FLEXS) insgesamt auf Näherungen beruhen (siehe hierzu auch Kapitel 2.3.2 bzw. Kapitel 3.1.7 Abbildung 25), so daß man mit einer gewissen „Unschärfe“, bezogen auf die Umsetzung der physiko-chemischen Eigenschaften, rechnen muß. Es ist davon auszugehen, daß bei allen Sulfonamiden der Einfluß der restlichen Bausteine dieser Moleküle die „angenährten“ physiko-chemischen Eigenschaften der Sulfonamidankergruppe verändern, daß eine Überlagerung mit dem sulfonamidischen Suchfragment nicht immer eindeutig erscheint. So werden z.B. die folgenden Verbindungen mit einem sehr hohen Ähnlichkeitsmaß bezogen auf die Sulfonamid-Referenz bewertet:



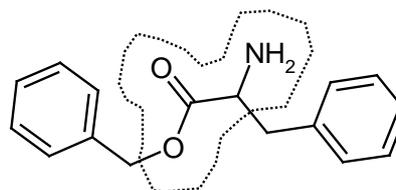
18



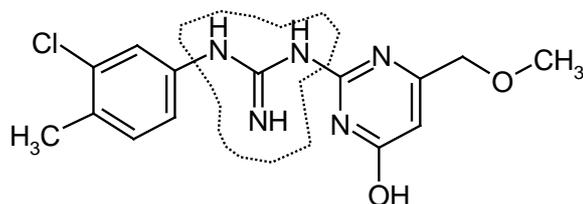
19



20



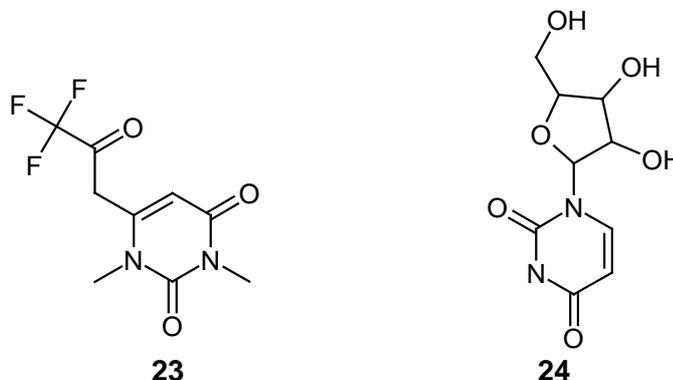
21



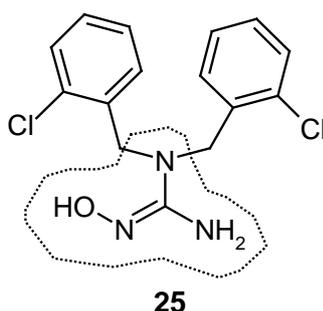
22

Bei den Strukturen **18**, **20**, **21** und **22** ist jeweils der Bereich, der durch das Suchfragment überlagert wurde, durch eine gestrichelte Linie gekennzeichnet. Diese Moleküle dürften allein aus sterischen Gründen keine guten Inhibitoren darstellen, da sie kaum an das zweifach positiv geladene Zink der humanen CAII koordinieren

können. Die konisch zulaufende Bindetasche bietet im Bereich des Zinkatoms maximal Raum für drei bis vier Atome. Die hier selektierten Verbindungen brauchen, um mit dem vorgeschlagenen Bereich zu binden, wesentlich mehr Raum.



Verbindung **23**, ein Thyminderivat, wurde ebenfalls mit einem höheren Ähnlichkeitsmaß als Sulfonamid-tragende Verbindungen bewertet. Eine strukturelle Verwandtschaft von **23** und auch **20** zu Uridin **24** ist an dieser Stelle durchaus zu erkennen. Überraschend ist hierbei jedoch, daß **24** als Ligand der Cytosin-Desaminase erfolgreich im Komplex kristallographisch untersucht werden konnte (PDB-Code: 1AF2). Die Cytosin-Desaminase ist ein Zink-tragendes Enzym und zeigt im Komplex mit **24** eine koordinative Wechselwirkung zwischen einem der Carbonylsauerstoffe des Uracilringes und dem Zinkatom (2.0Å) (Xiang *et al.*, 1997). Dieses Beispiel macht deutlich, daß RIGFIT durchaus in der Lage ist, zunächst unerwartete Zink-bindende Ankergruppen hervorzuheben.



Eine möglicherweise neue Zink-bindende Ankergruppe könnte bei Verbindung **25** vorliegen. Die Vermutung begründet sich hierbei durch die strukturelle Ähnlichkeit zu Hydroxamaten, aber auch zu den Zink koordinierenden Histidinseitenketten. Allerdings müßte bei dieser Verbindung einer der beiden Chlorphenylsubstituenten durch einen sterisch weniger anspruchsvollen Substituenten ersetzt werden, um an das Zink der humanen CAII koordinieren zu können.

Bei der durch das Sulfonamidfragment als Referenz ermittelten Reihung der Verbindungen der Datenbank würde man ca. 46.000 Verbindungen erhalten, wenn als Auswahlgrenze die „schlechteste“ bewertete Verbindung des Testdatensatzes angenommen werden würde. Nimmt man andererseits, wie bereits oben beschrieben, nur die Ankergruppenfragmente als Grenzwertgeber, so würde man von den ca. 46.000 Verbindungen nur ca. 15.000 weiterverwenden. Vermutlich besitzen die Ankergruppen-Fragmente insgesamt eine höhere Ähnlichkeit mit dem Sulfonamidfragment und werden deshalb mit einem höheren Ähnlichkeitsmaß bewertet.

Die Auswertung der Ergebnisse und die Berechnung der Anreicherungs-faktoren wurden mit PERL-SCRIPTEN^a durchgeführt. Zur Verwendung von RIGFIT in FLEXS wurde der folgende Parameter SET SUPERPOSITION_MODE auf 2 gesetzt.

Stellt man die beiden Methoden, die als erster Filterschritt eingesetzt wurden, gegenüber, so läßt sich anmerken, daß beide Methoden ohne umfangreiche Vorkenntnisse über mögliche Zink-bindende Ankergruppen nur bedingt erfolgreich zu einer Reduktion der Datenauswahl einsetzbar sind. Der Vorteil von RIGFIT ist, daß kein genaues Konnektivitätsmuster für eine Zink-bindende Gruppe vorgegeben werden muß. Die Abstraktion über eigenschaftsbeladene *Gauss*-Funktionen erlaubt prinzipiell auch ein Auffinden von neuen Fragmenten. Allein die Referenz (hier Sulfonamidgruppe) muß als bekannte Gruppe vorgegeben werden. Die RIGFIT-Suche impliziert allerdings als Schwierigkeit, daß ein Grenzwert für die noch als relevant angesehene Ähnlichkeit mit der Referenz definiert werden muß. Die unbefriedigende Anreicherung der Testdatensatzverbindungen macht klar, wie schwierig die Definition eines solchen „Grenzwertes“ ist. Eine Hinzunahme anderer Zink-bindender Gruppen als Referenz ergibt einen verbesserten Überblick. Dennoch muß jedoch in Kauf genommen werden, daß ein Teil der Testdatensatzverbindungen nicht selektiert wird. Nicht unbedingt kann jede durch den RIGFIT-Ansatz als ähnlich erkannte Gruppe auch als brauchbares Ankerfragment für einen vorstellbaren humanen CAII-Inhibitor angesehen werden. Mit dem Ansatz besteht allerdings die Chance, auf neue unerwartete Alternativen aufmerksam zu werden.

Betrachtet man den zeitlichen Aspekt, den die jeweiligen Rechnungen in Anspruch nehmen, so ist die 2D-Topologiesuche wesentlich schneller. Der große Nachteil dieser Methode bleibt jedoch, daß ausschließlich die Gruppen selektiert werden, die auch als Anfrage formuliert wurden. In diesem Sinne sind daher keine neuen Erkenntnisse zu erwarten.

^a Mit freundlicher Genehmigung von C. Lemmen, H. Gohlke und O. Krämer zur Verfügung gestellt.

Offensichtlich haben beide Methoden ihre Vor- und Nachteile. Sie brauchen sehr gute Kenntnisse über denkbare funktionelle Gruppen, die eine Bindung an das Zink ermöglichen könnten. Die mit RIGFIT erhaltenen Treffer sind somit eher als „Ideen“ für neue Fragmente zu sehen, die als mögliche Ankergruppen in Frage kommen könnten. Neben den bereits für die 2D-Topologiesuche eingesetzten Ankerfragmenten werden als neuen Fragmentbeispiele die aufgeführten Verbindung **18**, **19**, **20**, **21**, **22**, **23** und **25** gefunden. Mit den Verbindungen **20**, **23** und **25** konnte gezeigt werden, daß RIGFIT neue unerwartete Ankergruppen selektiert. Der strukturelle Vergleich von **23** und **24** zeigt, daß die gefundene Gruppe von **23** eine koordinative Bindung an Zink vermuten läßt. Allerdings ist mindestens eine der am Heterozyklus gebundenen Methylgruppen mit Wasserstoff zu substituieren, um in der konisch zulaufenden Bindetasche der humanen CAII an das Zink koordinieren zu können. Das Ankerfragment von **25** stellt hierbei die interessanteste Gruppe dar, da, wie bereits oben beschrieben, durchaus eine potentielle Koordination an das Zink denkbar wäre.

Im Hinblick auf die Wiederfindungsrate der vorgegebenen bekannten Sulfonamide besteht allerdings die Gefahr, daß beim Festsetzen eines strengen Grenzwertes der Ähnlichkeit zu viele Verbindungen mit einem brauchbaren Anker verloren gehen. Darin ist auch der Grund zusehen, warum bei den anschließenden Filterschritten die aus der 2D-Topologiesuche selektierten Verbindungen verwendet wurden.

3.1.3 Auswahl von Komplexstrukturen der HCAII

Für eine durch die Proteinstruktur vorgegebene Ligandensuche sind Informationen über den Aufbau der Bindetasche notwendig und, sofern vorhanden, Informationen über Bindungsmodi gebundener Substrate oder Inhibitoren. Die Auflösung der verwendeten Komplexstrukturen sollte dabei nicht größer als 2.5Å sein, da nur bis zu dieser Auflösung i.a. von einer hinreichend genauen Bestimmung der Orientierung der Liganden und Wassermoleküle in der Bindetasche ausgegangen werden kann.

Dieses Auswahlkriterium erfüllen 24 humane CAII-Komplexe^a. Bei der Auswahl handelt es sich ausschließlich um Proteinstrukturen des Wildtypes mit Inhibitoren. Der Auflösungsbereich liegt zwischen 1.6Å und 2.4Å.

^a PDB-Codes der 24 Protein-Ligand-Komplexe der CAII: 1AM6, 1BCD, 1BN1, 1BN2, 1BN3, 1BN4, 1BNN, 1BNQ, 1BNT, 1BNU, 1BNV, 1BNW, 1BV3, 1CIL, 1CIM, 1CIN, 1CNW, 1CNX, 1CNY, 1CRA, 1OKL, 1OKM, 1OKN, 3CA2

3.1.3.1 Überlagerung der Proteinstrukturen

Um Bewegungen von Seitenketten in der Bindetasche zu erkennen, wurden die 24 Komplexe mit dem Programm RELIBASE+ (Kapitel 2.6.1) überlagert.

Einzig konnte eine signifikante Konformationsänderung von His-64 beobachtet werden (Abbildung 17). Diese Seitenkettenbewegung wird ausgelöst durch den sterischen Anspruch eines Inhibitors (Kapitel 1.4.4.1) oder durch eine Änderung des pH-Wertes (Kapitel 1.3.3).

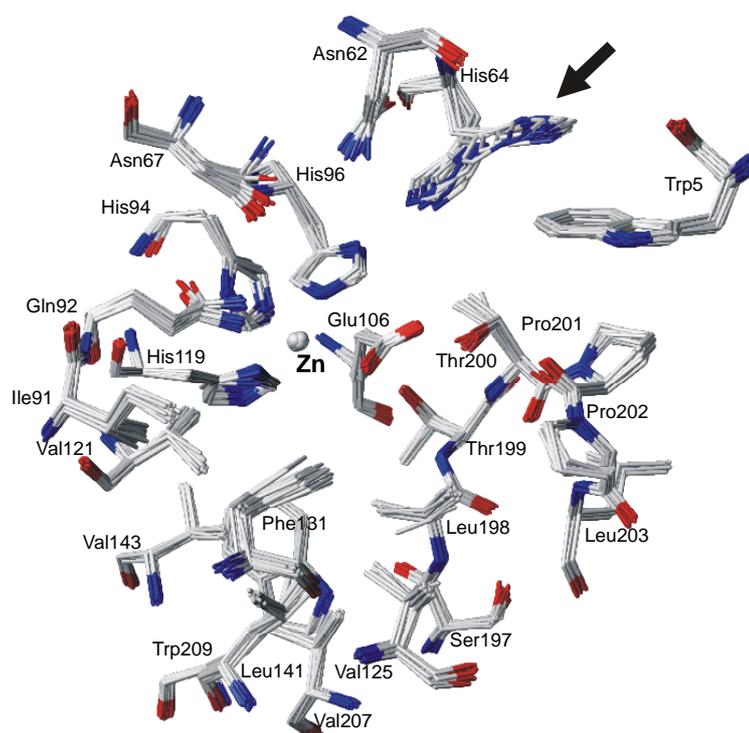


Abbildung 17 Überlagerung der 24 Komplexe (Liganden nicht gezeigt). Bewegung des His-64 ist durch den schwarzen Pfeil gekennzeichnet. Alle anderen Seitenketten zeigen keine nennenswerten Bewegungen.

3.1.3.2 Wasser in der Proteinbindetasche

Eine Identifizierung von Wassermolekülen, die in der Mehrzahl der analysierten Komplexstrukturen immer wieder an denselben Positionen in der Bindetasche gefunden werden, wurde durch die Überlagerung von Komplex- und Apostrukturen (Wildtyp) erzielt (Kapitel 2.7). Unter gleichzeitiger Berücksichtigung strukturtypischer Deskriptoren wie B-Faktoren, lokaler Hydrophobizitäten und benachbarter Wasserstoffbrückenpartner konnten vier Wassermoleküle (Tabelle 4) identifiziert werden (Abbildung 18). Diese ausgewählten Wassermoleküle zeigen teilweise Wechselwirkungen mit den Seitenketten der humanen CAII, aber keine mit den bisher strukturell untersuchten Inhibitoren. Wasser W393 wechselwirkt mit den Amidgruppen der Aminosäuren Asn-62 und Asn-67, Wasser-301 wechselwirkt mit der Hydroxylgruppe von Tyr-7 und dem Carbonylsauerstoff von His-64. Wasser W325 wechselwirkt nur mit den beiden Wassermolekülen Wasser W393 und Wasser W301. Wasser W394 wechselwirkt mit der Carboxylgruppe von Glu-69 (Abbildung 19).

Tabelle 4 *Zusammengefaßt sind die mit RELIBASE+ anhand der Temperaturfaktoren ausgewerteten Wassermoleküle. Ebenfalls in der gut aufgelösten (1.6Å) Struktur (1CIL) weisen die im Hinblick auf die weiteren Komplexe als konserviert bezeichneten Wassermoleküle einen deutlich kleineren Temperaturfaktor auf. Die Berechnung der Durchschnittswerte beruht auf der Auswertung von 20 Komplexstrukturen und einer Apostruktur.*

Wassermolekül	Temperaturfaktoren Å ²		Anzahl der Strukturen insgesamt
	1cil	Durchschnittswert	
301	13.7	15.9	21
325	18.4	24.4	8
393	13.7	27.0	16
394	21.4	31.6	12

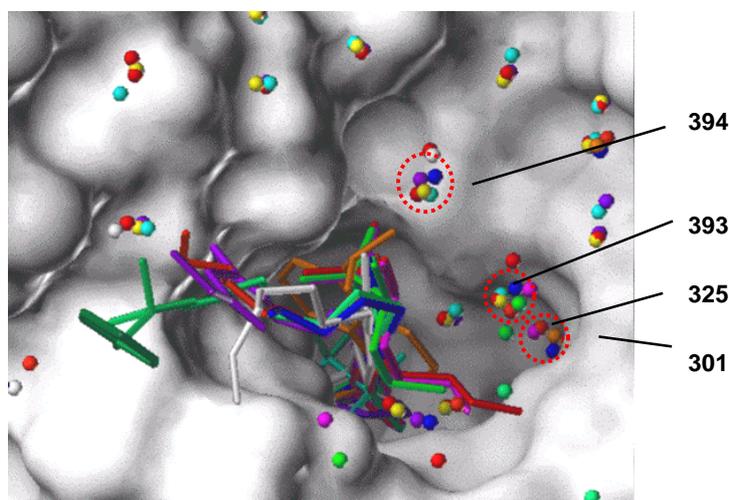


Abbildung 18 Überlagerte Bindetaschen der Komplexstrukturen. Die Farben kennzeichnen jeweils eine Proteinstruktur inklusive der dazugehörigen Wassermoleküle und Liganden. Mit gestrichelten Kreisen sind die Bereiche der "konservierten" Wassermoleküle hervorgehoben. Wasser W301 ist durch die in weiß dargestellte Connollyoberfläche nicht zu sehen. Deutlich zu erkennen sind die auftretenden Häufungen innerhalb der Kreise, was als Hinweis gewertet werden kann, daß diese Wassermoleküle besonders "fest" und schlecht verdrängbar an das Protein gebunden sind.

Um den Verdacht auf eine wenig begünstigte Verdrängbarkeit dieser Wassermoleküle zu untermauern, wurden Berechnungen der Lage und wechselseitigen Verbrückung dieser Wassermoleküle mit MAB/MOLOC (Kapitel 4.7.1) (Abbildung 19) durchgeführt. Während des Dockings (Kapitel 3.1.8) wurden anschließend diese Wassermoleküle zur sterischen Beschränkung der Bindetasche berücksichtigt. Zur Überprüfung der Relevanz der so platzierten Wassermoleküle im Hinblick auf ein Ligandendocking mit FLEXX wurden die Docking Ergebnisse mit Dorzolamid **5** als Testverbindung mit der Kristallstruktur dieses Komplexes verglichen. Ein RMS von 4.3Å wurde ohne zusätzliche Wassermoleküle erreicht, während mit den vier Wassermolekülen eine RMS-Abweichung von 1.5Å erhalten wurde. Durch die Einschränkung des Konformationsraumes, der den Verbindungen bei Berücksichtigung der Wassermoleküle in der Bindetasche zur Verfügung steht, konnte somit eine Verbesserung erzielt werden. Eine Berücksichtigung der Wassermoleküle inklusive ihrer Wasserstoffatome führte bei der Generierung der unterschiedlichen Bindungsmodi beim Einpassen der Liganden in die Bindetasche zu unbefriedigenden Ergebnissen. Da FLEXX allgemein gerichtete Wechselwirkungen stärker bewertet als ungerichtete, wurden überwiegend Konformationen generiert, die diese Wassermoleküle als Protonenakzeptor bzw. –donor für die funktionellen Gruppen der Liganden nutzen. Die Wassermoleküle wurden deshalb nur als sterische Hinderung eingesetzt. Die

ausgewählten Wassermoleküle zeigen in den kristallographisch bestimmten Protein-Ligand-Komplexen gerichtete Wechselwirkungen untereinander und mit einigen Seitenketten der Bindetasche beschreibenden Aminosäuren. Wechselwirkungen mit Liganden werden nicht beobachtet. Somit war es sinnvoll, diese Wassermoleküle nur als sterische Hinderung einzusetzen.

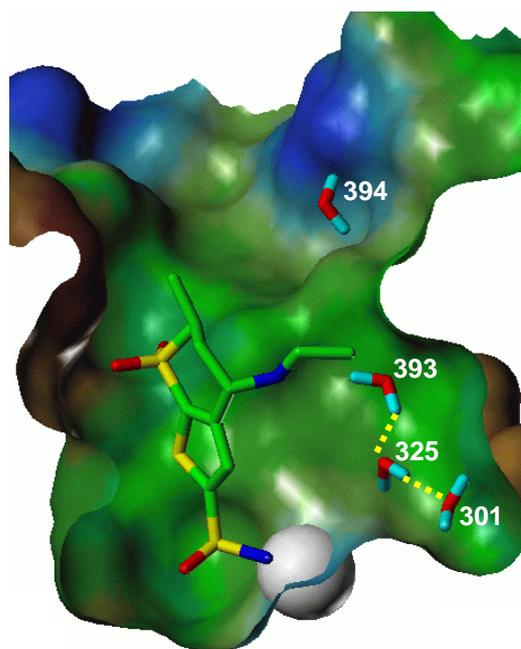


Abbildung 19 Mit MAB berechnetes Wasserbrückennetzwerk der vier konservierten Wassermoleküle am Beispiel des Dorzolamidkomplexes. Die gelbgestrichelten Linien geben die Richtung der H-Brücken an. Die Bindetasche ist als Connollyoberfläche dargestellt. Der Farbverlauf der Oberfläche beschreibt die Hydrophobizität innerhalb der Bindetasche, wobei braun für den hydrophilen und grün für den hydrophoben Bereich codiert. Als graue Kugel ist Zink am Boden der Bindetasche zu sehen.

3.1.4 Analyse der Bindetasche

Aufbauend auf dem in Kapitel 3.1.3.1 beschriebenen Schritt wurde die Bindetasche anhand verschiedener Sonden mit GRID, SUPERSTAR, und LUDI (Kapitel 2.5), sowie DRUGSCORE (Kapitel 2.4.2) untersucht. Diese Sonden tasten die Bindetasche auf mögliche Wechselwirkungen mit denkbaren funktionellen Gruppen eines Liganden ab. Als Sonden wurden eine C=O-Gruppe (H-Brückenakzeptor), eine amidische N-H-Gruppe (H-Brückendonor) und eine CH₃-Gruppe in SUPERSTAR und eine DRY-Gruppe in GRID (speziell parametrisierte hydrophobe Sonde) verwendet. Analog wurden bei DRUGSCORE folgende Ligandatome eingesetzt: als H-Brückendakzeptoren O.2 und O.3, als H-Brückendonor N.3 und N.ar und für die hydrophoben Wechselwirkungsbereiche

C.2, C.3 und C.ar. Die Felder wurden jeweils ohne Wasser und ohne Inhibitor in der Bindetasche berechnet. Qualitativ heben alle Methoden die gleichen Bereiche (Felder) hervor, sie weisen ihnen aber unterschiedliche Gewichtungen zu.

Ein visueller Vergleich der mit GRID und SUPERSTAR erzeugten Wechselwirkungsfelder zeigt, daß beide Programme annähernd gleiche Bereiche in der Bindetasche konturieren (Abbildung 20). Betrachtet man die Felder der einzelnen Wechselwirkungsgruppen, so lassen sich für die H-Brückenakzeptoren zwei Konturen in der Bindetasche erkennen, die für eine Wechselwirkung mit einem Inhibitor günstig sind. In der aktiven Konformation des Inhibitors Dorzolamid **5** ragen teilweise dessen exponierte Sauerstoffatome in Raumbereiche, die von diesen Feldern als besonders günstig hervorgehoben werden. Der erste kleine, nahezu kugelförmige Feldbereich befindet sich in der Nähe von Gln-92, der zweite etwas größere Feldbereich liegt in der Umgebung der Aminosäuren Thr-199, Thr-200 und dem Zinkatom. Ein weiterer günstiger Feldbereich von vergleichbarer Größe fällt in die hydrophile Region der amphiphilen Bindetasche nahe den Aminosäuren Asn-62 und Asn-67 (Abbildung 20b). Dieser Feldbeitrag umfaßt die Positionen, die von zwei, wahrscheinlich „in ihrer Position konservierten“ Wassermolekülen Wasser W325 und Wasser W393 in der Bindetasche des Dorzolamid-CAII-Komplex besetzt werden (Abbildung 20a) (siehe auch Kapitel 3.1.3.2). Die zur Visualisierung der H-Brückenakzeptor-Felder in SYBYL eingestellten relativen Konturlevel sind für SUPERSTAR 6.0 und für GRID –6.0 (diese Werte werden in SYBYL auf einer willkürlichen Zahlenskala angegeben).

Für die H-Brückendonor-Felder werden von beiden Methoden günstige Feldbeiträge berechnet, die sich durch langgezogene Konturierung im Bereich des Zink und Thr-199 bemerkbar machen. Ein weiteres größeres Feld im hydrophilen Bereich der Tasche nahe Asn-67 deckt sich ebenfalls in erster Näherung mit den Positionen der Wassermoleküle (Abbildung 20c). Die gewählten Konturlevel sind 6.0 für SUPERSTAR und –6.5 für GRID.

Die hydrophoben Felder werden ebenfalls von beiden Programmen durch sehr ähnliche Konturen hervorgehoben (Konturlevel: GRID –0.4 und SUPERSTAR 8.0). Schmale, langgestreckte Feldbeiträge entlang des hydrophoben Bindetaschenbereiches (Leu-198, Val-121, Val-143, Phe-131, Ile-91) werden von beiden Programmen berechnet. Vergleicht man allerdings diese hydrophoben Feldbeiträge mit dem Bindungsmodus von Dorzolamid **5**, so fallen die hydrophoben Ringsysteme des Inhibitors in der Bindetasche nicht exakt mit den durch die Konturflächen umfaßten Minima des hydrophoben Feldes zusammen. Ein Teil des durch GRID bzw. SuperStar angegebenen Feldbeitrages deckt sich gut mit dem Sechsring und der Ethylaminseitenkette von Dorzolamid (Abbildung 20d).

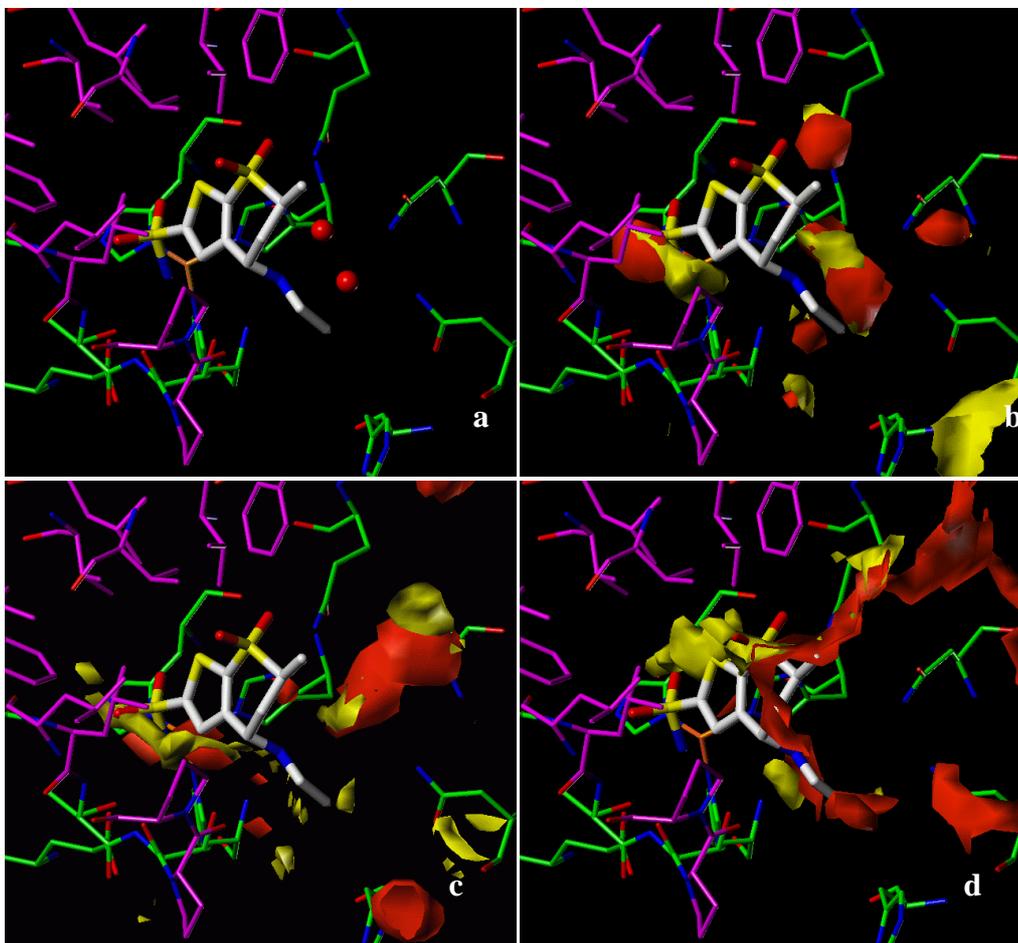


Abbildung 20 *Darstellung des amphiphilen Bindetaschenbereiches der humanen CAII. Die hydrophoben Aminosäuren sind violett eingefärbt und die hydrophilen Aminosäuren grün. Das Zinkatom ist orange eingefärbt. Die mit GRID erzeugten Felder sind gelb und die mit SUPERSTAR rot gefärbt. (a) Der Inhibitor Dorzolamid ist mit weißen Kohlenstoffatomen dargestellt, zwei Wassermoleküle sind als rote Kugeln zu erkennen. (b) H-Brückenakzeptoren-Feldbeiträge von GRID und SUPERSTAR in der Bindetasche der humanen CAII. (c) Konturierung der H-Brückendonoren-Feldbeiträge der beiden Methoden. (d) Darstellung der hydrophoben Feldbeiträge ebenfalls mit GRID und SUPERSTAR berechnet.*

Ein visueller Vergleich mit den von DRUGSCORE erzeugten Wechselwirkungsfelder bestätigt weitgehend die mit GRID und SUPERSTAR ermittelten Regionen. Gut stimmen die Wechselwirkungsbereiche der H-Brückenakzeptoren und der H-Brückendonoren überein (Abbildung 21a und b). Die mit DRUGSCORE bestimmten hydrophoben Feldbeiträge unterscheiden sich von denen mit GRID und SUPERSTAR dahingehend, daß

hier nur zwei relativ große und kompakte Bereiche hervorgehoben werden. Ein ellipsenförmiger Feldbeitrag befindet sich in der Nähe der hydrophoben Aminosäure Leu-198 und dem Zinkatom. Der zweite etwas kleinere Feldbeitrag ragt in den Bereich der Bindetasche, der durch die Bewegung der His-64 Seitenkette freigegeben werden kann (Kapitel 3.1.3.1 Abbildung 17). Die jeweils eingestellten Konturlevel sind der Beschriftung von Abbildung 21 zu entnehmen.

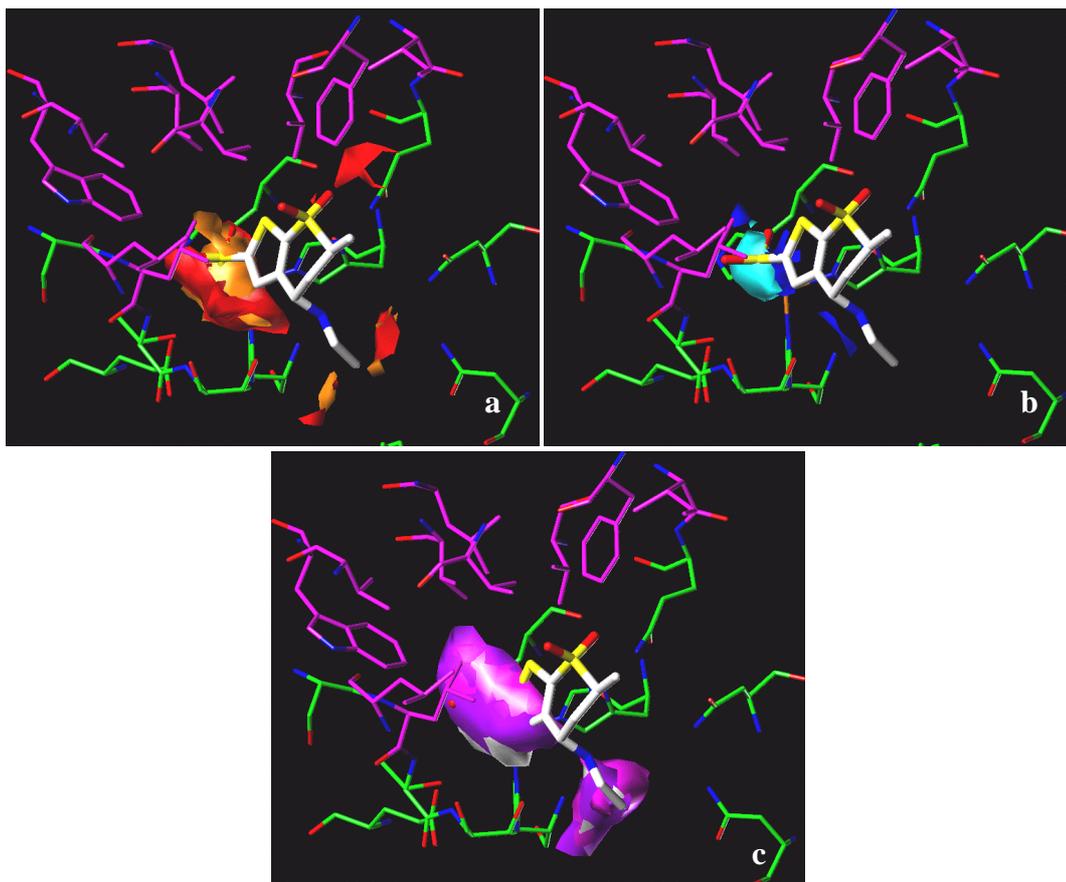


Abbildung 21 Gezeigt sind die Bindetasche der humanen CAII mit den violett eingefärbten hydrophoben und den grün eingefärbten hydrophilen Aminosäuren. Der Inhibitor Dorzolamid ist mit weißen Kohlenstoffatomen dargestellt. (a) Konturierung der H-Brückendonorfelder von DRUGSCORE anhand der Ligandatome O.2 (rot) und O.3 (orange) (Konturlevel 81%). (b) Konturierung der H-Brückenakzeptorfelder anhand der Ligandatome N.3 (blau) und N.am (hellblau) (Konturlevel 90%). (c) Hydrophobe Wechselwirkungsbereiche innerhalb der Bindetasche der humanen CAII anhand der Ligandatome C.2 (weiß), C.3 (violett) und C.ar (lila) (Konturlevel 82%).

Die von LUDI erzeugten Wechselwirkungszentren (Vektoren) für H-Brückendonor und -akzeptor sind an vergleichbaren Stellen der GRID- und SUPERSTAR-Felder platziert (Abbildung 22). Die hydrophoben Zentren häufen sich in der Nachbarschaft der

hydrophoben Aminosäuren. Betrachtet man den Bindungsmodus des Referenzinhibitors Dorzolamid, so fällt eine Häufung (Cluster) von hydrophoben Zentren im heterozyklischen Sechsring und entlang der Ethylaminseitenkette von Dorzolamid **5** auf. Dies steht im guten Einklang mit den Ergebnissen von GRID und SUPERSTAR.

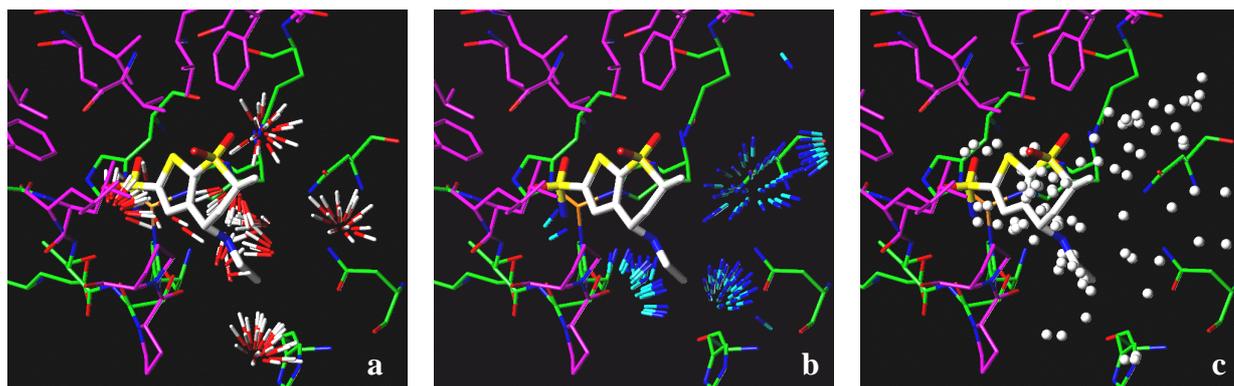


Abbildung 22 Gezeigt sind die mit LUDI berechneten Wechselwirkungszentren (a) für einen H-Brückenakzeptor (rot-weiße Stäbchen), (b) für einen H-Brückendonor (blau-hellblaue Stäbchen) und (c) für hydrophobe Wechselwirkungszentren (weiße Kugeln).

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß alle vier Methoden in der Lage sind, zumindest qualitativ bei dem gewählten Konturierungslevel für GRID, SUPERSTAR und DRUGSCORE für H-Brückenakzeptoren und H-Brückendonoren gut interpretierbare Feldbeiträge innerhalb der Bindetasche der humanen CAII zu generieren bzw. Zentren zu plazieren. Die Interpretation der hydrophoben Wechselwirkungsfelder/zentren ist auch bedingt durch die deutlich geringere Direktionalität hydrophober Wechselwirkungen, die weniger stark im Raum lokalisiert sind, nur eingeschränkt möglich. Zur gezielten Plazierung hydrophober Gruppen eines potentiellen Inhibitors anhand der Feldbeiträge wurden daher zusätzlich die Bindungsmodi aus den Kristallstrukturen der Inhibitor-Komplexe berücksichtigt.

3.1.5 Ableitung eines Pharmakophormodells

In dieser Arbeit wurden im Folgenden zur Ableitung des Pharmakophormodells in UNITY die durch SUPERSTAR generierten Feldbeiträge benutzt^a. Die als Minima angegebenen Feldbeiträge aus SUPERSTAR weisen im Vergleich zu GRID eine geringere Fragmentierung in auseinandergerissenen Bereichen auf und erscheinen daher besser für eine Umsetzung in ein Pharmakophormuster geeignet (Abbildung 20). Wie bereits im vorherigen Kapitel beschrieben, war eine Interpretation bei den erhaltenen Feldbeiträgen der C=O- und der N-H-Sonde gut möglich. Bei der CH₃-Sonde hingegen gestaltet sich eine Interpretation des Bereiches für ein Pharmakophormodell recht schwierig. Deshalb wurde das Modell durch die hydrophobe Raumerfüllung der im Bindungsmodus bekannten Inhibitoren ergänzt. Eine Überlagerung der Inhibitoren anhand der untereinander zur Deckung gebrachten Bindetaschen (Kapitel 3.1.3.1), ermöglichte zusätzlich die genaue Lokalisation des hydrophoben Bereiches (Abbildung 23).

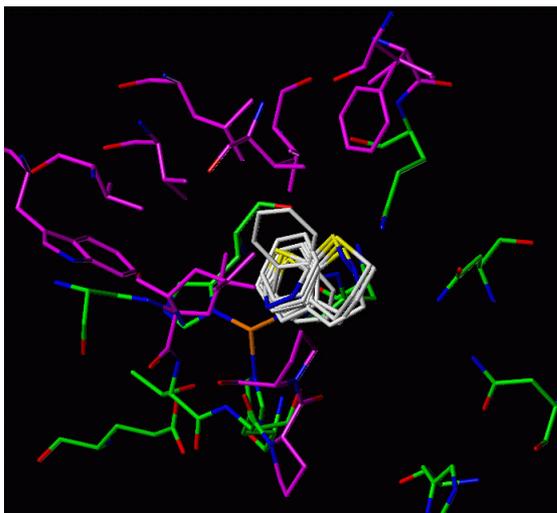


Abbildung 23 Gezeigt sind die überlagerten Liganden der Komplexstrukturen aus Tabelle 2. In der Bindetasche sind die auf die Ringsysteme reduzierten Inhibitoren zu sehen (weiß). Somit ist eine genaue Platzierung von hydrophoben Sphären im Raum zum Aufbau eines Pharmakophormodells in UNITY möglich.

Ein Pharmakophormodell wurde durch die Platzierung von fünf mit entsprechenden Eigenschaften belegten Sphären in UNITY aufgebaut. Eine Verbindung aus den

^a Daß bei diesem Schritt nicht die durchaus gleichwertigen Ergebnisse von DRUGSCORE berücksichtigt werden konnten, ist historisch begründet. Zum Zeitpunkt der Bindetascheanalysen stand DRUGSCORE noch nicht zur Verfügung. Die Analysen der Bindetasche, die mit DRUGSCORE durchgeführt worden sind (Kapitel 3.1.4), wurden zu einem späteren Zeitpunkt ergänzt, um zu untersuchen, ob vergleichbare Bereiche in der Bindetasche der *humanen* CAII hervorgehoben werden.

Datenbanken wird als Treffer gewertet, wenn Atome der gesuchten Eigenschaften bei einer flexiblen 3D-UNITY-Suche (Kapitel 2.3.1) innerhalb (einschließlich der äußeren Begrenzung) der vorgegebenen Sphären platziert werden. Somit gibt die Sphäre den räumlichen Toleranzbereich an, in den die Ligandatome entsprechender Eigenschaften platziert werden müssen. Die Größe der Sphäre, festgelegt durch den Toleranzradius um einen definierten Plazierungspunkt, definiert somit neben diesem Punkt in der Bindetasche auch den Suchbereich.

Zwei dieser Sphären wurden als H-Brückenakzeptoren definiert und in die entsprechenden SUPERSTAR-Felder platziert (Kapitel 3.1.4) (Abbildung 24). Die Lokalisation und Größe dieser Sphären wurde entsprechend der H-Brückenakzeptor-Wechselwirkungsfelder festgelegt. Eine Sphäre wurde somit in der Nähe der Amidgruppe von Gln-92 und eine zweite im Wechselwirkungsbereich der NH-Gruppe von Thr-199 positioniert. Für diese zwei H-Brückenakzeptor-Bereiche wurde ein Toleranzradius von 0.7 festgelegt.

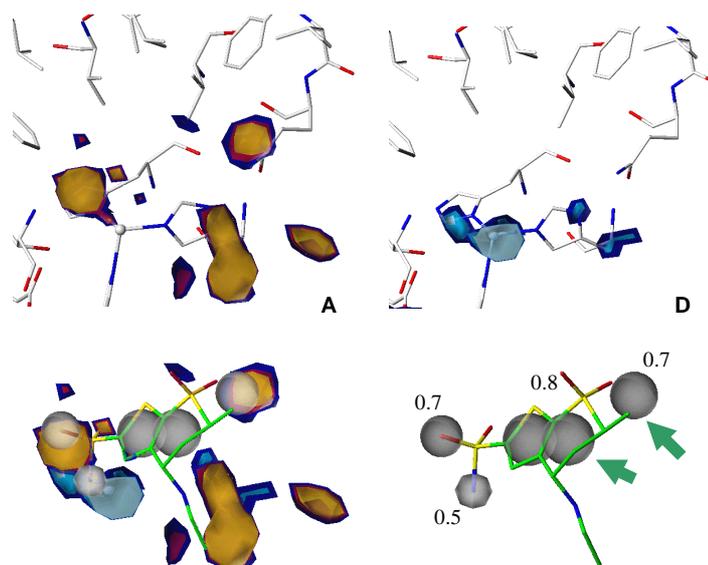


Abbildung 24 Analyse bevorzugter Wechselwirkungen für Akzeptoren (A) bzw. Wasserstoffbrückendonoren (D) in der Bindetasche der HCAII. Gezeigt sind die Ergebnisse mit SuperStar; analoge, wenn auch räumlich und im relativen Gewicht etwas andere Muster ergeben sich aus GRID und DrugScore. Die so ermittelte Verteilung der Felder wurde in eine Pharmakophor-Suchanfrage für UNITY übersetzt. Die Zahlenwerte an den Sphären sind der jeweilige Toleranzradius (Tolerance) einer Sphäre. Diese Bereiche müssen von einer als Treffer gewerteten Verbindung belegt werden. Grüne Pfeile deuten auf die Sphären, die als optional festgelegt worden sind.

Die Lokalisation der als H-Brückendonor definierten Sphäre resultierte zum einen aus dem erhaltenen SUPERSTAR-Feld in der Nähe von Thr-199, zum anderen aber auch aus

der Untersuchung der überlagerten Inhibitoren. Die wahrscheinlich einfach deprotonierten sulfonamidischen Stickstoffatome der Inhibitoren binden alle in derselben Weise an das zweifach-positiv geladene Zinkatom (Kapitel 1.4.2) und bilden, bezogen auf die drei Histidine (His-94, His-96, His-119) die vierte Position eines verzerrten Koordinationstetraeders. Die so plazierte Sphäre bekam einen Toleranzradius von 0.5 zugewiesen.

Die räumliche Zuordnung der Sphären für den hydrophoben Beitrag wurde aufgrund der oben beschriebenen Vorgehensweise durchgeführt. Es wurden insgesamt zwei Sphären gleicher Größe (Toleranzradius 0.8) eingesetzt, da sich bei der Überlagerung der Inhibitoren zeigte, daß eine Sphäre nicht geeignet schien, den eher elliptischen Bereich hydrophober Eigenschaften abzudecken. Wie ein Test des so definierten Pharmakophors für eine Suchanfrage mit UNITY zeigte, konnten nur 12 Beispiele des Testdatensatzes aufgefunden werden. Eine Option in UNITY erlaubt es, daß nicht alle Sphären durch Gruppen mit entsprechenden Eigenschaften besetzt werden müssen („partial match constrain“). Erst die Verwendung dieser aufgeweiteten Bedingungen führte zum vollständigen Wiederfinden aller Inhibitoren des Testdatensatzes. In die Suchanfrage wurde diese optionale Besetzung für zwei der insgesamt fünf vorgegebenen Sphären verlangt (Abbildung 24 grüne Pfeile). Ein Treffer wurde dann akzeptiert, wenn zusätzlich mindestens eine der beiden optional zugreifbaren Sphären belegt war.

3.1.6 Ergebnisse der 3D-Suchen mit UNITY

Der aus der 2D-Suche in Kapitel 3.1.2.1 erhaltene Datensatz von 5904 Verbindungen wurde im folgenden Filterschritt einer weiter einschränkenden flexiblen 3D-Suche unterworfen, die deutlich mehr Rechenzeit in Anspruch nahm. Das im vorherigen Kapitel in UNITY abgeleitete Pharmakophormodell kam hierbei zum Einsatz. Nach einer Rechenzeit von 5 Stunden verblieben 3314 Verbindungen. Die Vertreter des Testdatensatzes passierten wiederum vollständig diesen Filterschritt.

Um eine Reihung („Ranking“) dieser Verbindung anhand einer Scoringfunktion bzw. eines Ähnlichkeitsmaßes zu bestimmen und somit ein Entscheidungskriterium für den Vorschlag neuer potentieller Inhibitoren zu erhalten, standen zwei Alternativen als anschließende Filter zur Verfügung. Zum einen die flexible Überlagerung auf einem im Bindungsmodus strukturell bestimmten Inhibitor oder das flexible Einpassen der Verbindungen in eine als rigide vorgegebene Bindetasche. Eine Kombination beider Verfahren hat den Vorteil, daß auch Wissen über die chemische Struktur bekannter Inhibitoren in die Auswahl mit einfließt. Ein reiner Docking-Ansatz ignoriert dieses Wissen. Beispielsweise verweist die gesamte bisher bekannte Erfahrung über humane

CAII-Inhibitoren darauf, daß für dieses Enzym die Sulfonamidgruppe einen geeigneten Anker zur Zinkkoordination darstellt. Dieses Wissen wird implizit über eine Reihung mit FLEXS eingebracht. So konnte kürzlich Fradera *et al.* (Fradera *et al.*, 2000) in das Programm DOCK eine Bedingung einbeziehen, die gleichzeitig das Wissen um die Ähnlichkeit potenter Liganden bei dem Bindungsmodus mitberücksichtigt. Unter Einbeziehung von FLEXS wird somit auch diese Ähnlichkeitsbetrachtung in die Suchstrategie miteinbezogen.

3.1.7 Superpositionierung

Für die Überlagerung wurden Dorzolamid **5** und Acetazolamid **1** als Referenzen gewählt, beides potente und bekannte Inhibitoren, für die Bindungsgeometrien kristallographisch mit hoher Auflösung (PDB-Code und Auflösung: 1CIL 1.6Å (Smith *et al.*, 1994), 1ZSB 2.0Å (Huang *et al.*, 1996)) charakterisiert wurden.

Bei der flexiblen Überlagerung mit FLEXS (Lemmen *et al.*, 1999) (Kapitel 2.3.2) besteht mittlerweile die Möglichkeit unter Verwendung der *Gauss*-Funktionen einen „gemittelten“ Inhibitor zu bilden. Hierbei werden, wie bereits in Kapitel 2.3.2 beschrieben und in Abbildung 25 gezeigt, die physiko-chemischen Eigenschaften beschreibenden *Gauss*-Funktionen von **5** bzw. **1** mit denen von **EG3** vereint. Durch bilden der Vereinigungsmenge soll erreicht werden, daß vor allem bei strukturell größeren Datenbankverbindungen ein Einfluß auf den konformativen Aufbau eines zu überlagernden Liganden genommen wird. Ergebnisse, die ohne diese Erweiterung in FLEXS erhalten wurden, haben gezeigt, daß bei der Überlagerung von strukturell großen Verbindungen auf eine relativ gesehen kleine Referenz Konformationen als Lösung generiert werden, die nur bedingt einer aktiven Konformation entsprechen.

EG3 ist ein relativ großer Ligand, der nach dem **PLS**-Konzept (Kapitel 1.4.5) entwickelt wurde und von dem der Teil, der sich innerhalb der Bindetasche befindet, eindeutig röntgenkristallographisch charakterisiert ist (PDB-Code: 1CNY, siehe auch Testdatensatz Kapitel 3.1.1). Da sowohl **5** als auch **1** nur den Raum der Bindetasche füllen, der den Bereich bis ca. 8Å von dem Zinkatom umfaßt, die Bindetasche aber ca. 15Å tief ist, besteht durchaus die Möglichkeit, für neue größere (längere) Inhibitoren weitere Wechselwirkungen im Mündungsbereich der Tasche zu nutzen. Die Intention bestand darin, die verhältnismäßig kleinen Referenzmoleküle **5** bzw. **1** durch **EG3** dahingehend zu erweitern, daß zu überlagernde Verbindungen, die in der Raumerfüllung größer sind als die Referenzmoleküle, dennoch einen gerichteten konformativen Aufbau erfahren.

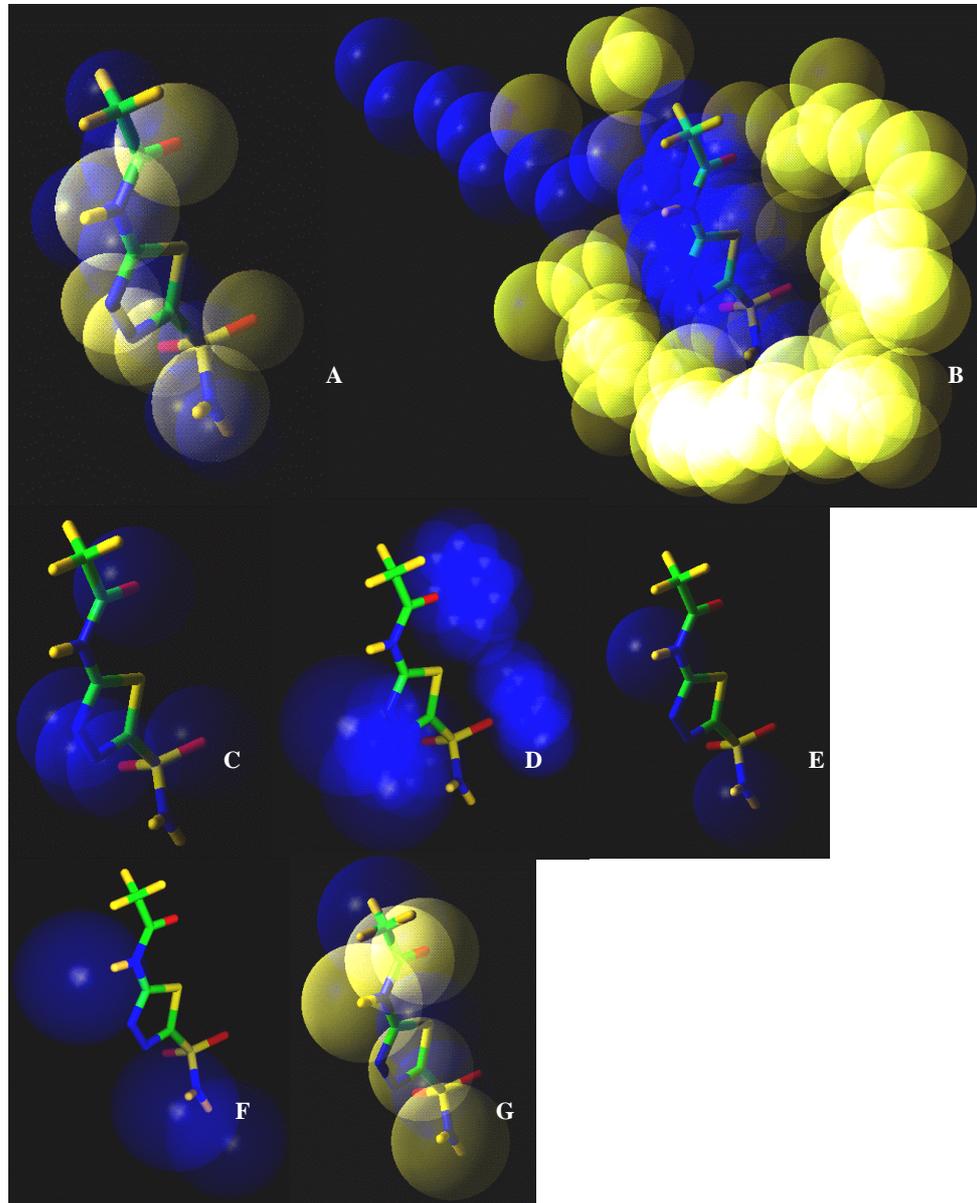


Abbildung 25 Dem Molekül Acetazolamid* anhand von Gaussfunktion der verschiedenen physiko-chemischen Eigenschaften zugewiesenen Eigenschaftsfelder: (A) Ladungsverteilung, (B) sterischer Anspruch: der gemittelten Inhibitoren Acetazolamid + **EG3**; umgebenden Proteinatome durch Kugeln approximiert, (C) H-Brückenakzeptor, (D) H-Brückenakzeptor-Geometrie (Richtung der möglichen Wechselwirkungspartner), (E) H-Brückendonator, (F) H-Brückendonator-Geometrie (Richtung der möglichen Wechselwirkungspartner), (G) hydrophobe Eigenschaften.

Weiterhin wurden von den die Bindetasche beschreibenden Aminosäuren Atompositionen übernommen, die die Bindetasche in Form von sterisch repulsiven *Gauss*-Funktionen räumlich begrenzen (Abbildung 25 B).

Dabei ließen sich folgende Ergebnisse erzielen: Durch eine Hinzunahme der Bindetasche begrenzenden *Gauss*-Funktionen konnten sehr große Inhibitoren, für die Überlappungen mit den die Bindetasche umgebenden Proteinatomen auftraten, ausgeschlossen werden. Die „zusätzlichen“ *Gauss*-Funktionen, die der Beschreibung des „gemittelten Inhibitors“ dienten, hatten nur einen eingeschränkten Einfluß auf den konformativen Aufbau, wie Testläufe mit dem Testdatensatz mit und ohne „gemittelten Inhibitor“ gezeigt haben. Ein Grund ist darin zu sehen, daß der Aufbau über 50%^a durch die Interaktionspunkte (Kapitel 2.3.2) des Referenzmoleküls gesteuert wird.

Durch die Hinzunahme des Testdatensatzes konnte ein Anreicherungsfaktor (Kapitel 1.5.1) errechnet werden. Dieser Faktor ist ein Maß für die Anreicherung an aktiven Verbindungen (Testdatensatz). Es diente als quantitatives Maß, wie gut das gegebene Suchkriterium potentielle Inhibitoren herausfiltert und diese auf die vorderen Ränge bei der Reihung durch den verwendeten Ähnlichkeitsindex plaziert. Zu berücksichtigen bleibt bei solchen Bewertungen, daß durch neugefundene potentiell affinere Verbindungen eine Verdrängung der aktiven Testdatensatzverbindungen aus den vorderen Rängen stattfinden kann, das zwangsläufig zu einem schlechteren Anreicherungsfaktor führt.

Insgesamt konnten mit Dorzolamid* von den ursprünglich 3314 eingesetzten Verbindungen 2237 erfolgreich überlagert und durch eine Ähnlichkeitsmaß^b bewertet werden. Ein Vergleich der erhaltenen Anreicherungsraten (Abbildung 26 Graph A und Graph B) zeigt, daß mit Dorzolamid* als Referenz nach 10% der durchsuchten Datenbankverbindungen ca. 45% der Testdatensatzverbindungen angereichert werden. Bei Acetazolamid* werden hingegen für nur 944 Verbindungen Lösungen bei den vorgegebenen Ähnlichkeitsmaß generiert und nach 10% der durchsuchten Datenbankverbindungen ca. 35% der aktiven Verbindungen (Testdatensatz) selektiert.

^a Persönliche Mitteilungen C. Lemmen.

^b Entsprechend der Standardeinstellungen in FLEXS. Siehe hierzu FLEXS 1.7 User Guide, Seite 60, Kapitel 8.4 Defining program parameters.

*Inklusive der Gaussfunktionen von **EG3** und den Bindetaschen begrenzenden repulsiven sterischen Gaussfunktionen.

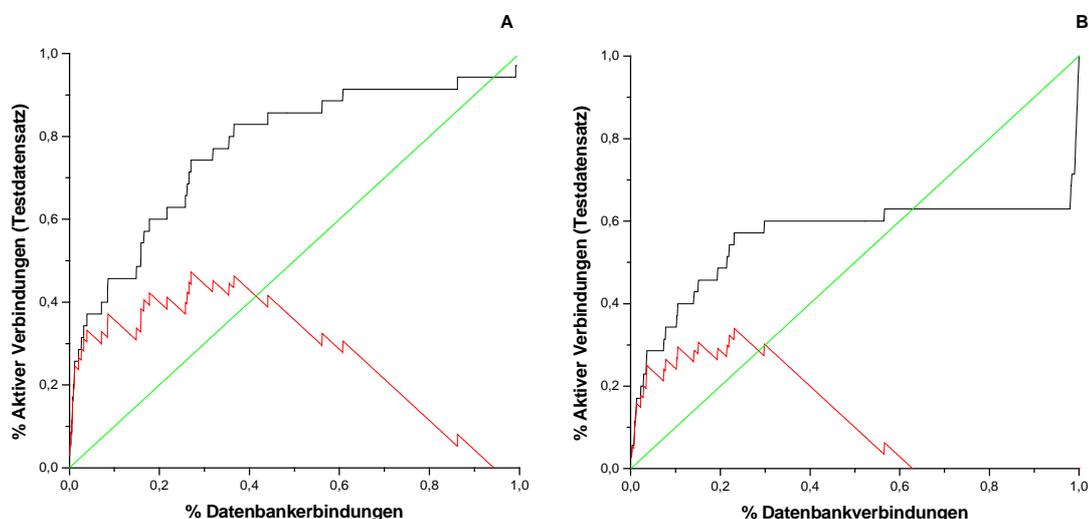


Abbildung 26 Anreicherungsrate durch Überlagerungen mit FLEXS. Die schwarze Kurven der beiden Graphen **A** und **B** geben jeweils den Verlauf der prozentualen Anreicherung an aktiven Verbindungen (Testdatensatz) korreliert mit dem Prozentsatz an durchgemusterten Datenbankverbindungen wieder. Graph **A** zeigt die Anreicherungsrate, die mit Dorzolamid + **EG3** unter Hinzunahme repulsiver Zentren aus dem Protein als Referenz erhalten wurden. Analog wurde Graph **B** für Acetazolamid + **EG3** + unter Hinzunahme repulsiver Zentren aus dem Protein erhalten. Die Diagonalen (grün) entsprechen einer zufälligen Auswahl an Testdatensatzverbindungen und die rote Kurve stellt jeweils die effektiven Anreicherungsrate dar. Diese effektive Anreicherungsrate ergibt sich aus der Differenz von zufälliger und mit FLEXS erzielter Auswahl der Testdatensatzverbindungen.

Deutlich zu erkennen ist an dem Verlauf der schwarzen Kurven von Graph **A** und Graph **B** (Abbildung 26), daß eine Anreicherung über eine zufällige Auswahl an Verbindungen hinaus stattfindet. Die Diagonalen (grün) in Graph **A** und **B** entsprechen jeweils einer zufälligen Auswahl an aktiven Verbindungen des Testdatensatzes. Diese Diagonale wird bei Dorzolamid* als Referenz (Graph **B**) erst nach ca. 95% der durchsuchten Datenbankverbindungen gekreuzt. Dies zeigt, daß nur bei einem geringen Prozentsatz der durchsuchten Datenbankverbindungen eine zufällige Auswahl an aktiven Verbindungen festzustellen ist. Bei Acetazolamid* (Graph **A**) findet ebenfalls eine deutlich über einer zufälligen Auswahl an aktiven Verbindungen liegende Anreicherung statt. Bei ca. 55% der durchsuchten Datenbankverbindungen kommt es jedoch zu einer Anreicherung, die schlechter ist als die zufällige Auswahl an aktiven Verbindungen. Die roten Kurven in Graph **A** und **B** Abbildung 26 entsprechen der Differenz aus einer zufälligen Auswahl an aktiven Verbindungen (Testdatensatz) und der mit FLEXS erzielten Auswahl (Anreicherung). Diese Kurven beschreiben den

effektiven „Gewinn“, der durch den Einsatz von FLEXS bei der Anreicherung von Testdatensatzverbindungen erhalten wurde. Bei beiden Referenzen ist offensichtlich, daß eine bessere Anreicherung als bei einer zufälligen Auswahl der Testdatensatzverbindungen erzielt wird.

Wird die Anreicherung schlechter als eine zufällige Auswahl an aktiven Verbindungen des Testdatensatzes, so sind Gründe hierfür wahrscheinlich in den Verbindungen des Testdatensatzes (u.a. Hydroxamate) zu sehen, die bei einer Überlagerung mit Dorzolamid* bzw. Acetazolamid* zu schlechter bewerteten Lösungen führen. Weiterhin findet sehr wahrscheinlich eine Verdrängung der aktiven Verbindungen des Testdatensatzes durch potentiell affinere Verbindungen aus der durchsuchten Datenbank statt. Im Zuge des virtuellen Screenings und der damit verbundenen gezielten Anreicherung potentiell affiner Verbindungen ist ein solches Ergebnis letztendlich auch gewünscht.

Die unterschiedliche Anzahl gefundener Verbindungen des Testdatensatzes bei der Überlagerung mit Dorzolamid* und Acetazolamid* stimmt mit den Ergebnissen, die bei der Bestimmung des Tanimotokoeffizienten (SimIndex) von Dorzolamid und Acetazolamid anhand der Verbindungen des Testdatensatzes getroffen wurden (Kapitel 3.1.1), näherungsweise überein. Bei Dorzolamid besteht eine größere Ähnlichkeit zu den Testdatensatzverbindungen als bei Acetazolamid, daher werden auch bei Dorzolamid* insgesamt mehr Verbindungen des Testdatensatzes überlagert als bei Acetazolamid*.

Eine detailliert Analyse der 100 am „besten“ platzierten Verbindungen von FLEXS mit Dorzolamid* bzw. Acetazolamid* als Referenz zeigt, daß von beiden Referenzen unter diesen 100 Verbindungen insgesamt nur 9 Verbindungen übereinstimmen. Die Auswertung der normierten Reihungen zeigt, daß sowohl bei Dorzolamid* als auch bei Acetazolamid* nur jeweils eine Verbindung bei den durch eine Normierung erhalten 100 „besten“ Verbindungen vorkommt, die mit den nicht normierten Reihungen übereinstimmt. Es besteht jedoch ein großer Überlapp von 59 Verbindungen, wenn man nur die durch die jeweiligen Normierungen erhalten 100 „besten“ Verbindungen untereinander vergleicht. Ein Ergebnis das zunächst überrascht, andererseits zeigt dieses Ergebnis, daß insgesamt nur eine begrenzte Anzahl an strukturell „kleinen“ Verbindungen unter den 3314 Verbindungen vorkommen kann, die dann bei beiden Referenzen dementsprechend positiv bewertet werden.

Stellt man die Zahl der erhaltenen Verbindungen anhand ihren Zink-bindenden Ankergruppen gegenüber, so ergeben sich die in Tabelle 5 aufgestellten Verteilungen.

Tabelle 5 Auswertung der 100 am „besten“ platzierten Verbindungen anhand der erhaltenen Ankergruppen, die bei der Überlagerung auf unterschiedliche Referenzen (Dorzolamid*, Acetazolamid*) erhalten wurden. Die durch eine Größennormierung des Ähnlichkeitsmaßes erhaltenen Verteilungen der Ankergruppen sind in der Spalte „+Normierung“ zusammengefaßt.

	<i>Dorzolamid*</i>		<i>Acetazolamid*</i>	
		+ Normierung		+ Normierung
Sulfonamide	45	40	40	43
Säureamide	32	52	26	43
Carbonsäuren	21	8	34	11
Hydroxamate	-	-	-	2
Diimide	1	-	-	1

Diese Auswertung ergibt, daß überwiegend Sulfonamide gefunden werden. Die verschiebt sich zu den Säureamiden, wenn mit Dorzolamid als Referenz bewertet und das Ähnlichkeitsmaß normiert wird. Verbindungen mit Säureamiden und Carbonsäuren als Ankergruppen werden allgemein mit einem „hohen“ Ähnlichkeitsmaß bewertet und nehmen dementsprechend einen Großteil der Treffer ein. Es fällt jedoch auf, daß kaum Hydroxamate unter den bestbewerteten Verbindungen zu finden sind. Die Auswertung der Anreicherungskurven (Abbildung 26), aber auch die in Tabelle 2 (Kapitel 3.1.1) aufgeführten SimIndices für Hydroxamate ließen jedoch ein solches Resultat erwarten.

Die Auswertung der jeweils 100 „besten“ Verbindungen zeigt, daß bei einer Größennormierung des Ähnlichkeitsmaßes (Kapitel 2.3.2) die Inhibitoren des Testdatensatzes, die in der Größe gleich oder kleiner als die Referenz waren, eine Anreicherung erfuhren. Ein visuelle Auswertung zeigt, daß ohne Normierung die Inhibitoren des Testdatensatzes vor allem die Beispiele angereichert wurden, die eine hohe strukturelle Ähnlichkeit mit der Referenz besaßen.

Da, wie bereits oben erwähnt, eine Verdrängung der aktiven Verbindungen des Testdatensatzes durch potentiell affiniere Verbindungen stattfinden kann und um eine möglichst große Zahl an strukturell diversen Verbindungen zu berücksichtigen, wurden bei der Auswahl der insgesamt 100 Vorschläge für das Einpassen in die Bindetasche die Ergebnisse aus dem Vergleich mit beiden Referenzen unter Berücksichtigung der Größennormierungen des Ähnlichkeitsmaßes in Betracht gezogen.

3.1.8 Docking

Im folgenden Schritt wurden die mit FLEXS bewerteten Verbindungen mit FLEXX (Rarey *et al.*, 2000) in die Bindetasche eingepaßt. Es wurden insgesamt 100^a der am „besten“ platzierten Verbindungen von FLEXS ausgewählt, einerseits um ihre Paßform auf die Bindetasche zu überprüfen, andererseits um durch die Scoringfunktion in dem Dockingverfahren eine weitere Reihung und insbesondere eine quantitative Affinitätsvorhersage zu bekommen.

Die Bindung der sulfonamidischen Gruppe an das in der Bindetasche vorhandene Zink wurde zunächst durch die gezielte Modifizierung (Atomtypenänderung, Formalladung setzen, Deprotonierung) erzwungen, wobei FLEXX auch Geometrien mit einer zweizähnigen Koordination an das Zink ausbildet. Da in allen experimentellen Komplexstrukturen von einer Vierfachkoordination am Zink ausgegangen wird, muß diese Koordinationserweiterung als unwahrscheinlich gelten. Allerdings tritt Zink, wie Auswertungen der Kristallstrukturen kleiner Moleküle zeigen, durchaus häufig mit Fünfbindigkeit auf. Eine Weiterentwicklung des *MapRef*-Modus in FLEXX ermöglicht mittlerweile die Verwendung eines sogenannten Referenzfragmentes. Hierbei wird die funktionelle Gruppe des Inhibitors (sulfonamidischer Anker) in seiner von dem Bindungsmodus bekannter Inhibitoren abgeleiteten räumlichen Orientierung als Referenzfragment vorgegeben. Alle potentiellen Inhibitoren, die ebenfalls dieses Fragment besitzen, wurden so, beginnend mit der Überlagerung dieses Fragmentes, mit dem sulfonamidischen Referenzfragment in die Bindetasche eingepaßt.

Ein besonderes Problem stellte die partielle Hydratisierung der Bindetasche dar. Wie bereits in Kapitel 3.1.3.2 besprochen, wurden vier Wassermoleküle als sterische Blockierung beim Einpassen der potentiellen Inhibitoren in der Bindetasche berücksichtigt.

Im Anschluß wurden die mit FLEXX in die Bindetasche der humanen CAII eingepaßten und bewerteten Bindungsmodi der einzelnen Verbindungen einer weiteren Bewertung durch DRUGSCORE unterzogen. Hierbei greift DRUGSCORE auf die von FLEXX erzeugten Plazierungen der einzelnen Verbindungen zu und führt eine neue (nachgeschaltete) Reihung und Bewertung durch.

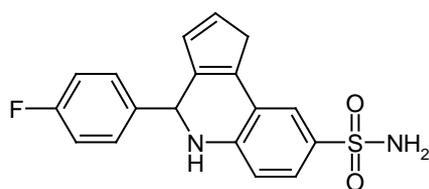
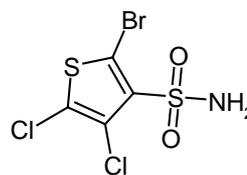
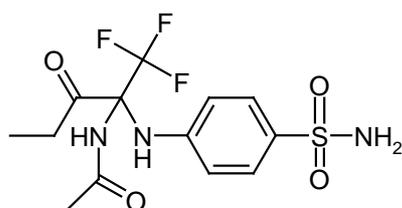
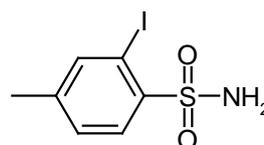
^a Ausschließlich Verbindungen aus den Datenbanken LEADQUEST und MAYBRIDGE.

3.1.9 Auswahl der Vorschläge

Die Auswahl der Vorschläge beruht auf den durch FLEXS, FLEXX und DRUGSCORE vorgenommenen Bewertungen und einer abschließenden visuellen Auswertung der einzelnen Bindungsmodi, die u.a. auf Analysen der amphiphilen Bindetasche basiert. Ferner wurden bei der Auswahl der einzelnen Vorschläge die Deskriptoren (z.B. MlogP, Anzahl drehbarer Bindungen usw.) in Betracht gezogen, die auch bei der Analyse des Testdatensatzes angewendet wurden (Kapitel 3.1.1).

Aufgrund der Vielzahl an unterschiedlichen Kriterien, die bei der Auswahl der Vorschläge berücksichtigt wurden, werden in den anschließenden Kapiteln die Vorschläge ausführlich besprochen, die letztendlich zu einer biochemischen Testung vorgeschlagen wurden.

Kriterien, die bei der Auswahl der Verbindungen eine entscheidende Rolle spielten, werden im folgenden vorgestellt. Zur optimalen Ausfüllung der amphiphilen Tasche bieten sich neben den bereits in Kapitel 3.1.2.1 beschriebenen Ankergruppen im weiteren Verlauf des Ligandenaufbaus in der Tasche z.B. 5-, 6-, bi- oder trizyklische Ringsysteme an, wobei auch heterozyklische Systeme bei der Auswahl berücksichtigt wurden. Die Bindung von starren Ringstrukturen ist in der Regel mit einem kleineren Verlust an inneren Freiheitsgraden verbunden im Vergleich zu flexiblen, kettenförmigen Liganden. Aus entropischen Gründen sollte dies zu einer Verbesserung der Affinität führen. Weiterhin wurden Ring-Substituenten mit H-Akzeptor-Gruppen (z.B. C=O-Gruppen) gesucht, die Wasserstoffbrücken zu Gln-92 oder zu Thr-200 ausbilden können. Diese Wechselwirkungen müssen die zur Ligandbindung erforderliche Desolvatation der Aminosäuren kompensieren.

**26****27****28****29**

Anhand einzelner Beispiele aus der Menge der 100 „best bewerteten“ Verbindungen soll gezeigt werden, welche Kriterien neben den oben beschriebenen zusätzlich angelegt wurden, um die Auswahl der eigentlichen Vorschläge weiter einzugrenzen. Ein großer Teil der insgesamt durch FLEXS hochbewerteten Verbindungen waren Säureamide und Carbonsäuren. Diese Verbindungen wurden, da ein Schwerpunkt auf die Verbindungen gelegt wurde, die einen sulfonamidschen Anker (bzw. Hydroxamat) besaßen, nur bedingt als mögliche Vorschläge in Betracht gezogen. Begründen läßt sich dies, zum einen durch die bereits in den vorherigen Kapiteln beschriebenen guten Bindungseigenschaften der Sulfonamide und zum anderen in der kapazitiven Beschränkung im Hinblick auf die Beschaffung und biochemische Testung der Verbindungen. Anhand der exemplarisch gezeigten Verbindungen **26**, **27**, **28** und **29**, die unter den 100 „best bewerteten“ Verbindungen lagen, werden weitere Ausschlußkriterien vorgestellt. **26** steht für die Gruppe von Verbindungen, die aufgrund von sterisch sehr ausladenden zyklischen Ringsystemen, in der Bindetasche der humanen CAII eine Koordination der Sulfonamidgruppe an das Zink erschweren. Verbindung **27** steht stellvertretend für die Gruppe von Verbindungen, die eine Vielzahl an rotierbaren Bindungen und somit eine hohe konformative Flexibilität insgesamt besitzen, was zunächst auch hier als Ausschlußkriterium gewertet wurde. **28** steht exemplarisch für eine Gruppe von Verbindungen, die an *beiden ortho*-Positionen zur Sulfonamidgruppe am Ringsystem Substituenten (-CH₃, -Cl, -I, -Br) tragen und damit in der konisch zulaufenden Bindetasche nur bedingt eine Koordination der Sulfonamidgruppe an das Zink erlauben. Für die Gruppe der Verbindungen, die relativ klein sind und keine weiteren Substituenten tragen, die eine gerichtete Wechselwirkung ermöglichen, steht Verbindung **29**. Unter Berücksichtigung aller oben beschriebenen Ausschlußkriterien ließen sich die zunächst 100 „best bewerteten“ Verbindungen um 41 Verbindungen reduzieren.

FLEXX erzeugt eine Vielzahl von Bindungsmodi eines Liganden innerhalb der Bindetasche, wobei jede Plazierung jeweils durch eine Scoringfunktion bewertet wird. Die Problematik, die hierbei auftritt, ist, daß man bei einer kleinen Zahl von Verbindungen alle Konformationen einer visuellen Auswertung unterziehen kann, um eventuell weitere oder andere Bindungsmodi zu bevorzugen, die die Programme DRUGSCORE oder FLEXX nicht als „beste“ Lösung bewertet haben. Bei einer großen Zahl an eingepaßten Verbindungen ist dies dagegen nicht mehr möglich^a. Bei der

^a Geht man von durchschnittlich 100 unterschiedlichen Bindungsmodi pro Verbindung aus, so wären allein bei 100 eingepaßten Verbindungen 10.000 Bindungsmodi auszuwerten.

Auswahl der Vorschläge wurden deshalb sowohl die von FLEXX als auch von DRUGSCORE als „beste Lösungen“ vorgeschlagenen Bindungsmodi berücksichtigt.

Die Vorschläge werden in den folgenden Kapiteln anhand ihrer berechneten Bindungsmodi und weiterer Deskriptoren (wie MlogP-Werte bzw. drehbare Bindungen) in Gruppen zusammengefaßt diskutiert. Die Verbindungen sind nach ihrer Kennung in der jeweiligen Datenbank benannt.

3.1.9.1 Para-substituierte-Benzolsulfonamide

Ähnlich zu den nach dem **PLS**-Konzept entwickelten Substanzen (Kapitel 1.4.5) besitzen die noch nicht als humane CAII-Inhibitor in der Literatur beschriebenen Verbindungen **0076-89** und **2000-01524** ihre Substituenten am Benzolring in *para*-Stellung zur Sulfonamidgruppe. Beide Verbindungen stammen aus der LEADQUEST-Datenbank. **0076-89** besitzt in *para*-Stellung eine 6-gliedrige Seitenkette mit u.a. einer Ether- und einer Esterfunktion, während **2000-01524** dagegen eine Carbonsäure in *para*-Stellung aufweist.

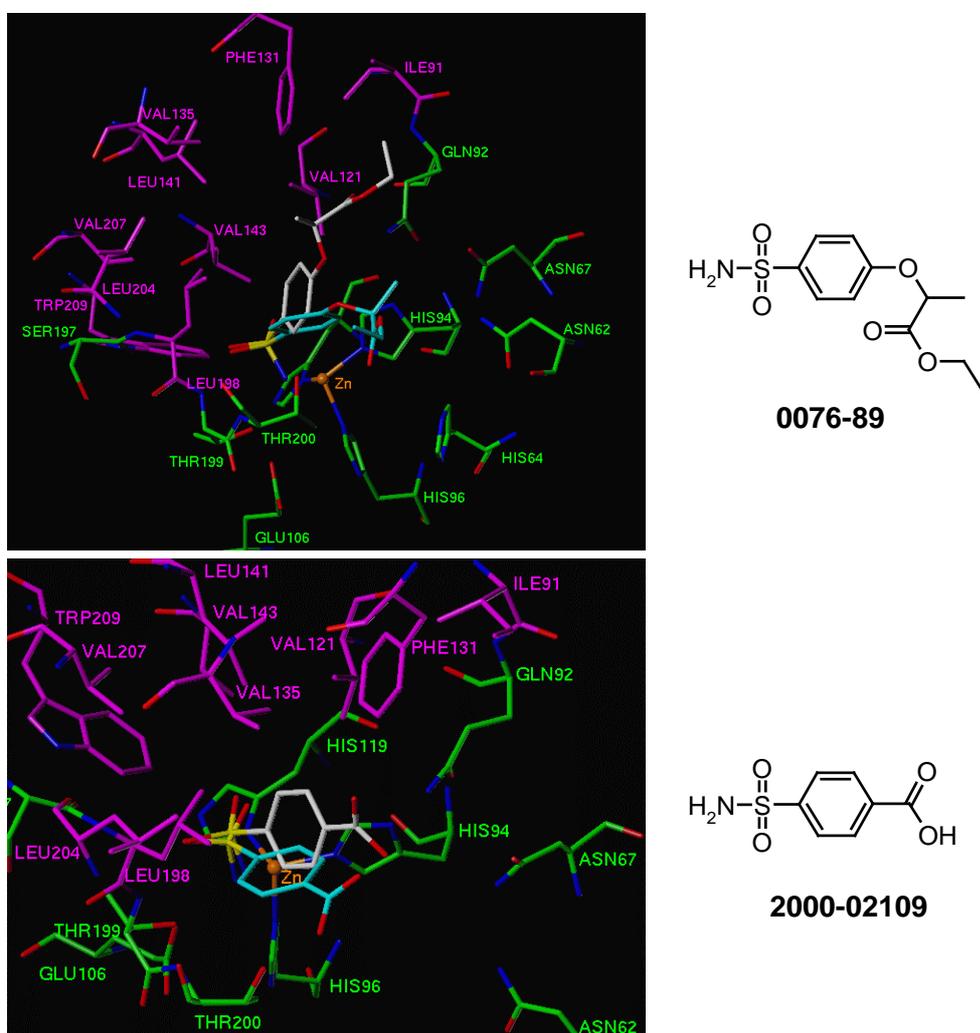


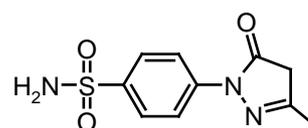
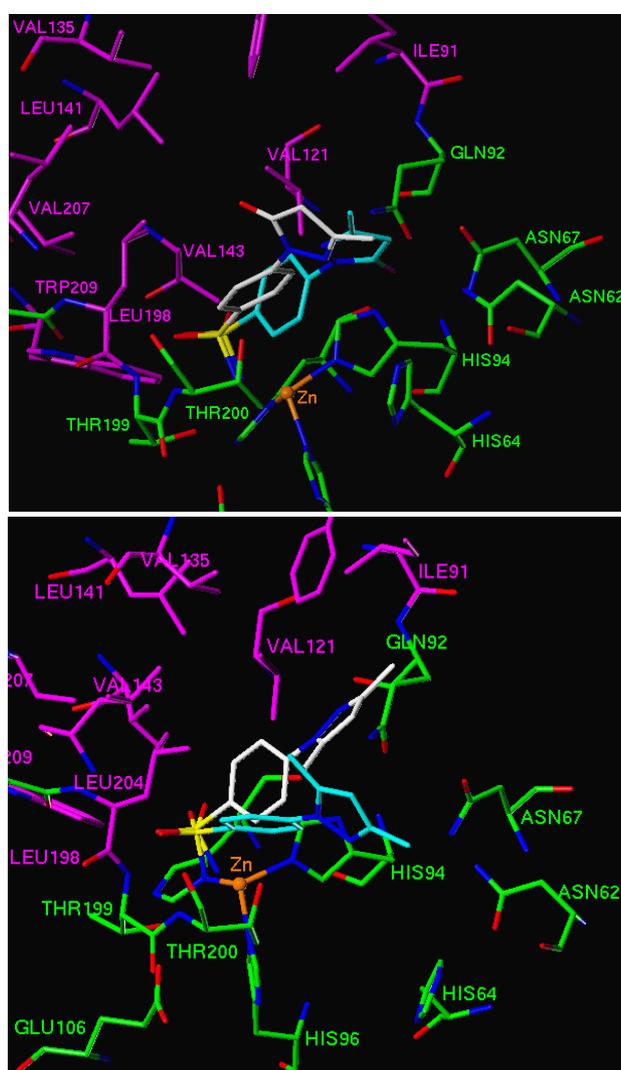
Abbildung 27 Bindetasche der humanen CAII mit den auf Rang 1 bewerteten und eingepaßten Lösungen von DRUGSCORE (weiß) und FLEXX (hellblau) für die Verbindungen **0076-89** und **2000-02109**. Die hydrophoben Aminosäuren der Bindetasche sind grün, die hydrophilen violett gefärbt.

In Abbildung 27 sind Dockinglösungen von FLEXX gezeigt, die durch die Scoringfunktionen in FLEXX (im Folgenden der Einfachheit halber mit FLEXX abgekürzt) und durch DRUGSCORE als beste Platzierung angegeben werden.

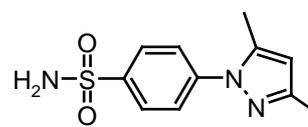
Die Auswertung der Wechselwirkungen von **2000-02109** und **0076-89** ergibt, daß bei beiden Verbindungen der Stickstoff der sulfonamidischen Gruppe mit dem Zink und der Hydroxylgruppe von Thr-199 wechselwirkt. Einer der beiden sulfonamidischen Sauerstoffatome bildet mit dem peptidischen Stickstoff von Thr-199 eine Wasserstoffbrücke. Der Bindungsmodus entspricht somit dem, der durch den *MapRef*-Modus vorgegeben ist. Bei der Stellung des Benzolringes und der Seitenketten unterscheiden sich die Lösungen von DRUGSCORE und FLEXX deutlich voneinander (Abbildung 27). Betrachtet man zunächst **2000-02109**, so werden bei der Lösung von FLEXX zwei Wasserstoffbrückenbindungen der Carboxylsauerstoffatome angegeben, eine mit der Hydroxylgruppe von Thr-200 (3.0Å) und eine weitere mit dem peptidischen Sauerstoff von Pro-201 (2.8Å). Die „beste“ DRUGSCORE-Lösung entspricht der FLEXX-Lösung auf Position 46 und besitzt außer den durch die sulfonamidische Kopfgruppe auftretenden gerichteten Wechselwirkungen nur hydrophobe Wechselwirkungen, die durch den Benzolring mit der Seitenkette von Leu-198 bestimmt sind. Die Carboxylgruppe bleibt hier ohne gerichtete Wechselwirkungen. Offensichtlich werden Wasserstoffbrückenbindungen durch die Scoringfunktion in FLEXX deutlich stärker bewertet als eine Summe von ungerichteten hydrophoben Wechselwirkungen.

Vergleicht man die durch FLEXX bzw. DRUGSCORE am besten bewerteten Lösungen für Verbindung **0076-89**, so zeigt sich, daß bei FLEXX neben den erwarteten Wechselwirkungen des Sulfonamidankers mit Zink und Thr-199 eine weitere Wasserstoffbrückenbindung von dem Carbonylsauerstoff der Estergruppe mit der Hydroxylgruppe von Thr-200 vorgeschlagen wird. Bei DRUGSCORE (FLEXX-Lösung 5) wird hingegen eine Ausrichtung der Seitenkette hin zu den hydrophoben Resten von Val-121 und Ile-91 und eine gerichtete Wechselwirkung des Carbonylsauerstoffes der Estergruppe mit der Amidgruppe von Gln-92 als beste Lösung bewertet. Auch der Benzolring, der 90° gedreht zur besten FLEXX-Lösung vorliegt, zeigt analog zu der DRUGSCORE-Lösung von **2000-02109** hydrophobe Wechselwirkungen mit der Seitenkette von Leu-198. Vergleicht man die vorgeschlagenen Bindungsmodi von FLEXX und DRUGSCORE mit den Kristallstrukturen verschiedener **PLS**-Komplexe (Tabelle 2), so entsprechen die DRUGSCORE-Lösungen besser den dort aufgefundenen Bindungsmodi. Verbindung **0076-89** besitzt 9 rotierbare Bindungen und damit eine große Zahl an inneren Freiheitsgraden, die bei der Bindung „eingefroren“ werden müssen. Die Intention bei der Auswahl dieser Verbindung für eine experimentelle

Testung war, daß, wie die Lösung von DRUGSCORE zeigt, gerichtete Wechselwirkungen der Ester- und Ethergruppen und hydrophoben Wechselwirkungen der Methylgruppen diesen Verlust kompensieren könnten. Beide Verbindungen wurden als Vorschläge ausgewählt, weil sie eine Erweiterung des PLS-Konzeptes (Kapitel 1.4.5) darstellen und speziell bei **2000-02109** die Möglichkeit besteht, sie als Baustein für weitere Inhibitoren durch kombinatorische Synthesen zu verwenden. Der berechnete Verteilungskoeffizient MlogP fällt für **0076-89** auf 0.65 und für **2000-02109** auf 0.45, d.h. beide liegen in einem Bereich, der ausreichende Wasserlöslichkeit bei beiden Verbindungen erwarten läßt.



0114-01



0009-46

Abbildung 28 Bindetasche der CAII mit den auf Rang 1 bewerteten und eingepaßten Lösungen von DRUGSCORE (weiß) und FLEXX (hellblau) für die Verbindungen **0114-01**, **0009-46**. Die hydrophoben Aminosäuren der Bindetasche sind grün, die hydrophilen violett gefärbt.

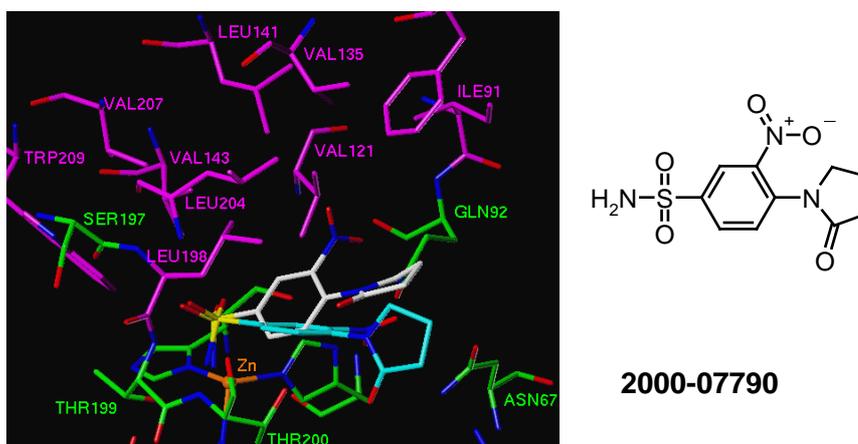


Abbildung 29 Bindetasche der humanen CAII mit den auf Rang 1 bewerteten und eingepaßten Lösungen von DRUGSCORE (weiß) und FLEXX (hellblau) für die Verbindungen **2000-07790**. Die hydrophoben Aminosäuren der Bindetasche sind grün, die hydrophilen violett gefärbt.

0114-01 und **0009-46** sind Benzolsulfonamide, die terminal mit derivaten in *para*-Stellung zur Sulfonamidgruppe substituiert sind. **2000-07790** besitzt in *para*-Stellung zur Sulfonamidgruppe eine Pyrrolidinon- und in *meta*-Stellung eine Nitrogruppe und wird ebenfalls zu dieser Gruppe von Verbindungen gezählt. Alle Moleküle stammen aus der LEADQUEST-Datenbank und stellen ebenfalls bisher noch nicht in der Literatur beschriebene Verbindungen in Bezug auf die Substituenten am Benzolring dar.

Bei allen drei Verbindungen sind die Sulfonamidgruppen entsprechend des *MapRef*-Modus gebunden und wechselwirken wie bereits oben beschrieben. Die Stellung des Benzolringes ist bei allen „besten“ Lösungen von FLEXX und DRUGSCORE unterschiedlich, eine Konsequenz der jeweiligen Wechselwirkungen mit den angefügten Substituenten. Bei **0114-01** ist der mit einer Methylgruppe substituierte und einer Carbonylfunktion besetzte Dihydro-Pyrazolinonring in der FLEXX-Lösung so orientiert, daß Wasserstoffbrücken mit den Amidgruppen von Asn-67 (2.9Å) und Gln-92 (3.0Å) mit dem Carbonylsauerstoffatom des Dihydro-Pyrazolinonringes ermöglicht werden. Bei der DRUGSCORE-Lösung hingegen (FLEXX-Lösung 81) ist die Carbonylgruppe zu den hydrophoben Resten der Bindetasche orientiert. Es werden keine gerichteten Wechselwirkungen des Dihydro-Pyrazolinonringes beobachtet. Während bei der Lösung von FLEXX für **0009-46** nur hydrophobe Wechselwirkungen der Methylsubstituenten am Pyrazolinonring mit z.B. Val-121 möglich sind, wird bei der DRUGSCORE-Plazierung eine gerichtete Wechselwirkung zwischen dem Dihydro-Pyrazolinonstickstoff und der Amidgruppe von Gln-92 (2.9Å) generiert. Eine Überprüfung in ISOSTAR bestätigte die Geometrie und die Art dieser Wechselwirkung. Der Benzolring ist bei dieser Lösung deutlich zu den hydrophoben Resten der

Bindetasche orientiert (Abbildung 29 und Abbildung 29) vergleichbar mit der DRUGSCORE-Lösung für **0076-89**. Für **2000-07790** werden bei beiden Lösungsvorschlägen neben den Wechselwirkungen der Sulfonamidgruppe nur noch gerichtete Wechselwirkungen zur Nitrogruppe vorgeschlagen. Der Carbonylsauerstoff des Pyrrolidinonringes bleibt bei beiden Lösungen jedoch ohne gerichtete Wechselwirkungen. Die Lösung von FLEXX zeigt, daß die Nitrogruppe zu den Amidgruppen der Aminosäuren Asn-67 (3.6Å) und Gln-92 (2.6Å) orientiert vorliegt. DRUGSCORE schlägt eine Lösung (FLEXX 61) vor, in der die Nitrogruppe in Richtung der hydrophoben Seitenketten der Aminosäuren mit nur einer gerichteten Wechselwirkung zu der Amidgruppe von Gln-92 (2.5Å) steht. Die Drehung der Nitrogruppe um ca. 90° zur Ebene des Benzolringes bei der von DRUGSCORE vorgeschlagenen Konformation wurde durch eine Analyse von Kleinmolekülkristallstrukturen der CSD (*Cambridge Structural Database*) (Allen *et al.*, 1991) bestätigt, die ebenfalls einen Benzolring mit einer Nitrogruppe als Substituenten tragen. Befinden sich wie bei **2000-07790** sterisch anspruchsvolle Liganden am Benzolring in *ortho*-Stellung zur Nitrogruppe, so ist eine solche Konformation durchaus zu beobachten.

Diese Vorschläge stellen alle noch nicht publizierte Verbindungen dar. Neben den oben beschriebenen günstigen Wechselwirkungen wurde als weiteres Entscheidungskriterium für die Auswahl dieser Verbindungen die MlogP-Werte von 0.42 für **2000-0779**, 0.29 für **0114-01** und 0.68 für **0009-46** gesehen und die insgesamt geringe Zahl an drehbarer Bindungen. Die berechneten Verteilungskoeffizienten weisen auf eine ausreichende Wasserlöslichkeit hin.

3.1.9.2 Halogen-substituierte Benzolsulfonamidocarbonsäuren

Die zwei Verbindungen **2000-01951** und **2000-01524** besitzen beide jeweils ein Halogenatom in *ortho*-Stellung zur Sulfonamidgruppe, erstere ein Chlor- und letztere ein Bromatom. Neben der Carbonsäure in *meta*-Stellung zur Sulfonamidgruppe besitzt **2000-01951** in *para*-Stellung ein weiteres Chloratom als Substituent am Benzolring.

Die Löslichkeit der Verbindungen, abgeschätzt anhand der berechneten MlogP-Werte, sollte bei **2000-01951** am geringsten sein, denn durch beide Chlorsubstituenten ergibt sich mit 1.3 die größte Hydrophobie aller betrachteten Verbindungen. Bei **2000-01524** befindet sich eine Carbonsäure anstelle des Chloratoms, so daß sich für diese Verbindung einen MlogP von 0.94 errechnet, was im direkten Vergleich der beiden Verbindungen eine bessere Löslichkeit erwarten läßt.

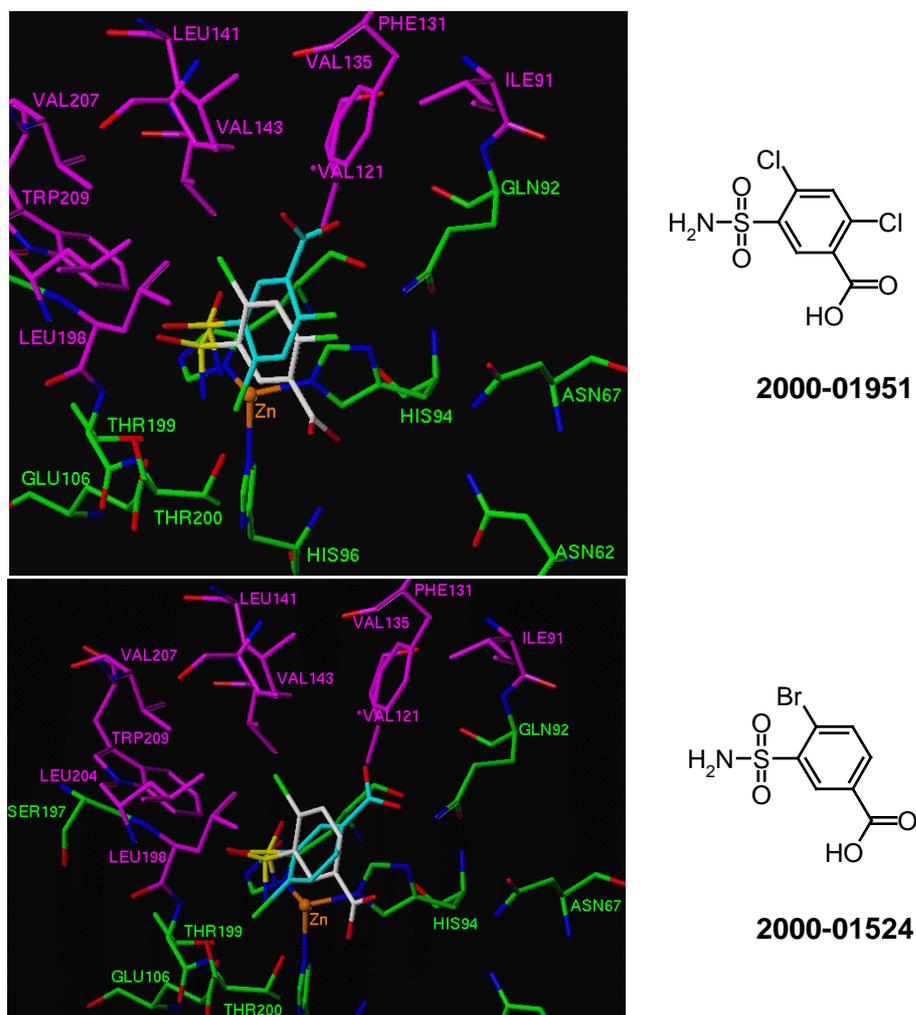


Abbildung 30 Bindetasche der humanen CAII mit den auf Rang 1 bewerteten und eingepaßten Lösungen von DRUGSCORE (weiß) und FLEXX (hellblau) für die Verbindungen **2000-01951** und **2000-01524**. Die hydrophoben Aminosäuren der Bindetasche sind grün, die hydrophilen violett gefärbt.

Die Bindungsmodi der durch FLEXX am besten bewerteten Plazierungen zeigen neben den Wechselwirkungen der Sulfonamid Gruppe für beide Verbindungen eine Wasserstoffbrücke zwischen einem der Carboxylsauerstoffe und der Amidgruppe von Gln-92. Durch diese gerichtete Wechselwirkung werden die Halogenatome in *ortho*-Stellung zur Sulfonamidgruppe in Richtung der hydrophilen Aminosäuren Thr-199 und Thr-200 orientiert. Bei den DRUGSCORE-Lösungen hingegen werden gerichtete Wechselwirkungen der Carboxylatgruppe mit der Hydroxylgruppe von Thr-200 (2.8Å) gebildet. Bei diesen Vorschlägen orientieren sich die *ortho*-Halogenatome in den hydrophoben Bereich (Val-143, Leu-198, Trp-209) der Bindetasche. Diese Platzierung erscheint aufgrund der hydrophoben Wechselwirkung wahrscheinlicher. Die Auswahl dieser Verbindungen zur Testung begründet sich mit der Annahme, daß durch die

Halogenatome in *ortho*-Stellung zur sulfonamidschen Gruppe am Benzolring zusätzliche hydrophobe Wechselwirkungen ermöglicht werden, die die Affinität dieser Verbindungen erhöhen sollte.

3.1.9.3 Bi- und trizyklische Sulfonamide

Die folgenden fünf Moleküle umfassen Benzolsulfonamide, die mit ein bis zwei Ringsysteme fusioniert sind. **0134-36** stammt aus der LEADQUEST-Datenbank, kommt aber ebenfalls als **BTB03218** gekennzeichnet in der MAYBRIDGE-Datenbank vor. **NRB01507**, **JFD00715** und **NRB00993** entstammen ebenfalls der MAYBRIDGE- und **2000-06688** aus der LEADQUEST-Datenbank. Der Bindungsmodus der Zink-bindenden sulfonamidischen Gruppe entspricht bei allen folgenden Verbindungen dem des *MapRef*-Modus.

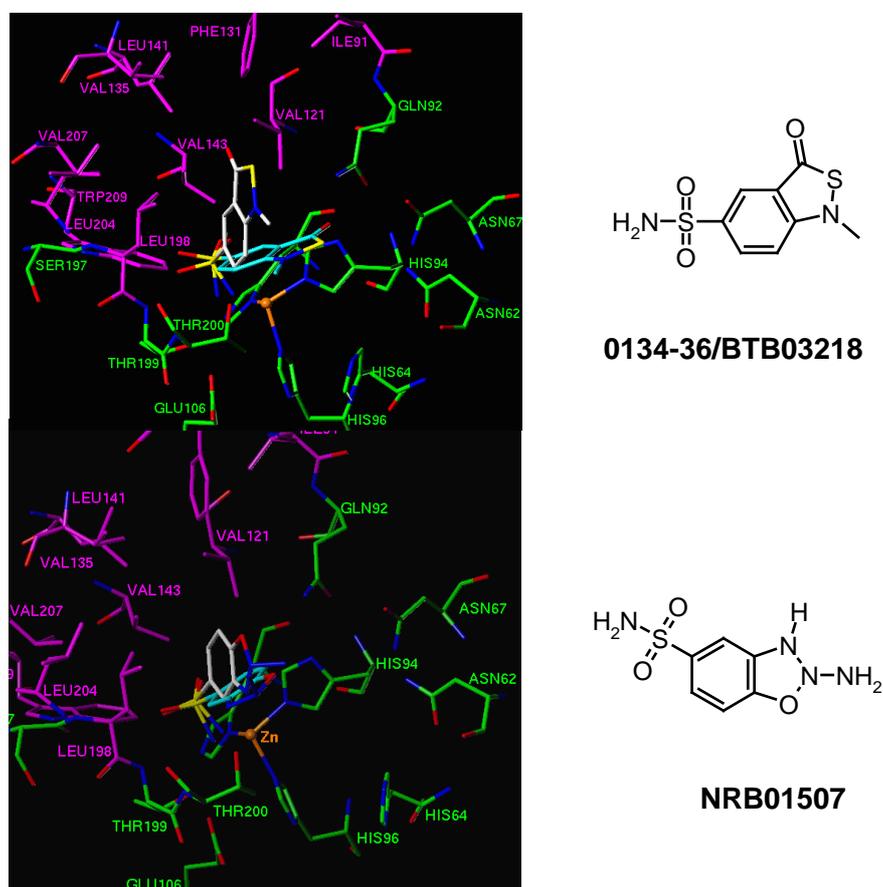


Abbildung 31 Bindetasche der humanen CAII mit den auf Rang 1 bewerteten und eingepaßten Lösungen von DRUGSCORE (weiß) und FLEXX (hellblau) für die Verbindungen **0134-36/ BTB03218**, **NRB01507**. Die hydrophoben Aminosäuren der Bindetasche sind grün, die hydrophilen violett gefärbt.

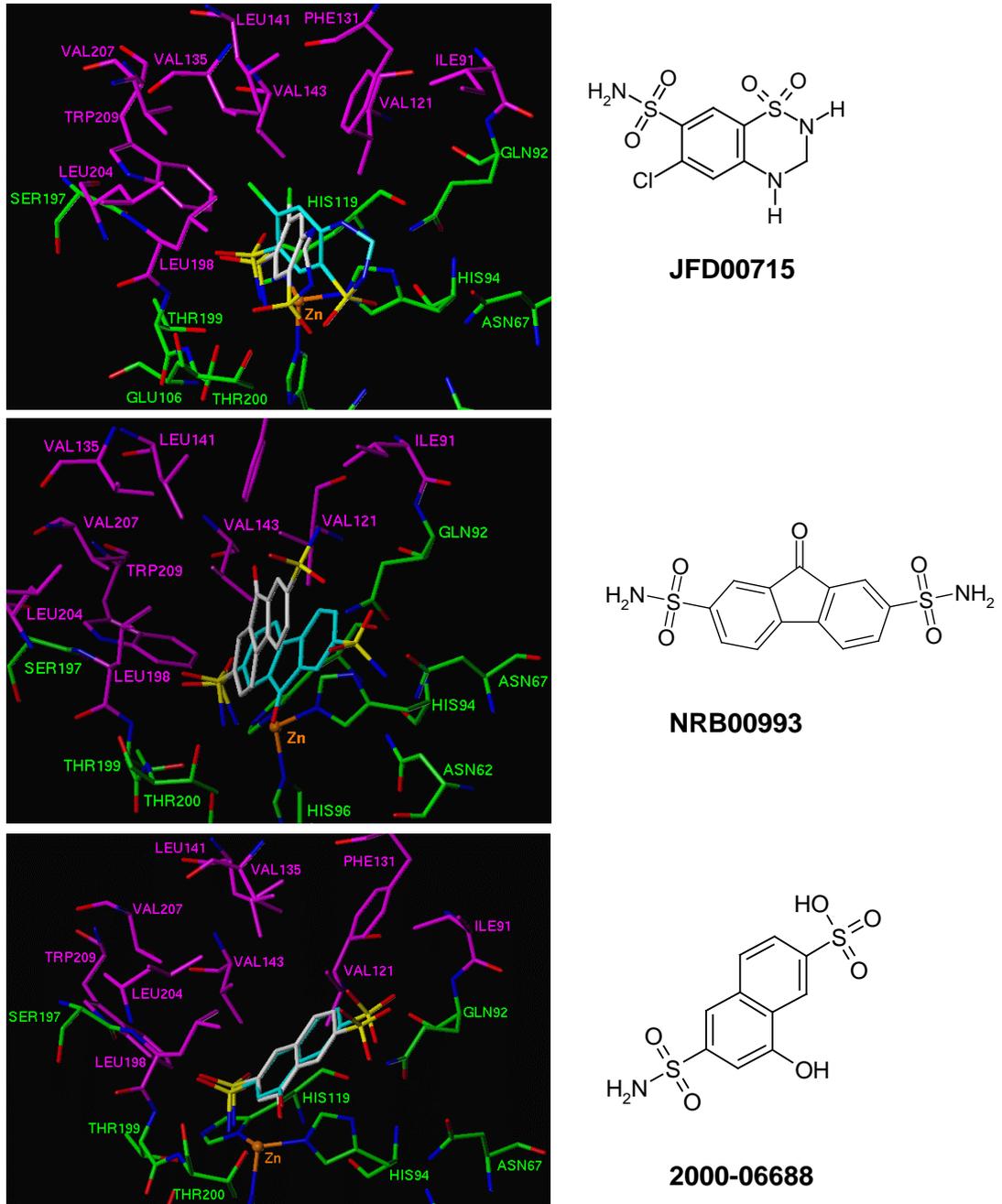


Abbildung 32 Bindetasche der humanen CAII mit den auf Rang 1 bewerteten und eingepaßten Lösungen von DRUGSCORE (weiß) und FLEXX (hellblau) für die Verbindungen **JFD00715**, **NRB00993** und **2000-06688**. Die hydrophoben Aminosäuren der Bindetasche sind grün, die hydrophilen violett gefärbt.

Die Analyse der vorgeschlagenen Bindungsmodi, der beiden durch fünfgliedrige Heterozyklen erweiterten Benzolsulfonamide zeigt, daß bei der FLEXX-Lösung für **0134-36/BTB03218** der Carbonylsauerstoff des Thiazolin-onrings gerichtete Wechselwirkung mit den Amidgruppen von Asn-67 (3.5Å) und Gln-92 (2.6Å) eingeht. Hydrophobe Wechselwirkungen werden im Gegensatz zur DRUGSCORE-Lösung (FLEXX-Lösung 51) hierbei nicht festgestellt. Bei dem Vorschlag von DRUGSCORE wird die Stellung des Ringsystems hauptsächlich durch hydrophobe Wechselwirkung mit den Aminosäureseitenketten von Leu-198 und Leu-204 beeinflusst. Analog ist die Stellung des Ringsystems bei dem durch DRUGSCORE (FLEXX-Lösung 12) vorgeschlagenen Bindungsmodus für **NRB01507** (Abbildung 32). Der Vorschlag von FLEXX und DRUGSCORE läßt eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen dem Stickstoff des Amino-Isox Diazol-Ringes und der Hydroxylgruppe von Thr-200 (2.7Å) zu. Die Hydrazingruppe bleibt bei beiden Modi ohne gerichtete Wechselwirkungen. **JFD00715** (Hydrochlorothiazid) hat ebenfalls wie die in Kapitel 3.1.9.2 vorgeschlagene Verbindung ein Chloratom in *ortho*-Stellung zur Sulfonamidgruppe. Der am Benzolring gebundene Dihydro-dioxo-thiadiazinring ergänzt die Verbindung zu einem bizyklischen System. Bei dem von FLEXX und DRUGSCORE (FLEXX-Lösung 45) bewerteten Bindungsmodus wird von einem der Sauerstoffatome des Dihydro-dioxo-thiadiazinringes eine Wasserstoffbrücke mit der Hydroxylgruppe von Thr-200 gebildet. Bei der FLEXX-Lösung kommt noch eine weitere gerichtete Wechselwirkung hinzu, eine Wasserstoffbrücke des zweiten Sauerstoffatoms des Dihydro-dioxo-thiadiazinringes mit der Amidgruppe von Gln-92 (3.0Å). Das in *ortho*-Stellung befindliche Chloratom wechselwirkt bei beiden Vorschlägen mit den hydrophoben Proteinseitenketten. Bei dem FLEXX-Vorschlag sind Val-143, Leu-198, Val-207 die Aminosäuren, die als Wechselwirkungspartner dienen, bei der DRUGSCORE-Lösung stammen die bevorzugten Seitenketten von Phe-131 und Val-121.

Bei **2000-06688** sind die Vorschläge für die „besten“ Bindungsmodi von beiden Scoringfunktionen nahezu identisch. Der DRUGSCORE-Vorschlag (FLEXX-Lösung 35) entspricht weitestgehend dem von FLEXX generierten Bindungsmodus (Abbildung 32). Die Stellung des Naphthylringes wird durch eine Wasserstoffbrückenbindung des Hydroxylsauerstoffatoms mit der Hydroxylgruppe von Thr-200 (2.5Å) und durch die hydrophoben Wechselwirkungen des Ringsystems mit den hydrophoben Proteinseitenketten Leu-204, Leu-198 und Val-143 bestimmt. Die Sulfonsäuregruppe verbleibt bei beiden Bindungsmodi ohne gerichtete Wechselwirkung mit den Resten der Bindetasche.

Die Wechselwirkung von Anthracenon-disulfonamid **NRB00993** ist bei dem DRUGSCORE-Vorschlag (FLEXX-Lösung 86) ohne gerichtete Wechselwirkung, der

Sauerstoff der Ketogruppe ist auf die hydrophoben Aminosäuren der Bindetasche orientiert. Die weitere Sulfonamidgruppe bleibt analog zur Sulfonsäuregruppe von **2000-06688** ohne gerichtete Wechselwirkung mit der Bindetasche. Eine hydrophobe Wechselwirkung des Ringsystems mit Leu-198 ist ebenfalls zu beobachten. Bei dem von FLEXX präferierten Bindungsmodus werden wiederum Wasserstoffbrücken als bestimmende Wechselwirkungen angegeben. So besteht eine Wasserstoffbrücke zwischen dem Carbonylsauerstoff und der Hydroxylgruppe von Thr-200 (3.1Å) und zwischen dem Stickstoff der zweiten nicht zum Zink orientiertensulfonamidischen Gruppe und der Amidgruppe von Asn-67 (3.1Å) (Abbildung 32).

Für die Auswahl dieser Verbindungen zur *in vitro*-Testung spricht, daß bei der Auswertung der Bindungsmodi jeweils ein Großteil der erwarteten Wechselwirkungen abgedeckt werden und somit eine hohe Affinität der Verbindungen anzunehmen ist. Starre Ringsysteme haben gegenüber langkettigen, flexiblen Verbindungen den Vorteil, daß sie durch die geringe Anzahl drehbarer Bindungen entropisch begünstigt sind. Die berechneten Verteilungskoeffizienten (MlogP) dieser Vorschläge liegen in einem Bereich von 0.45 bis -0.15, somit lassen sie eine ausreichende bis gute Wasserlöslichkeit erwarten.

3.1.9.4 Thiophensulfonamide

Zur der Klasse der Thiophensulfonamide zählen die folgenden Verbindungen: **0049-01** und **0191-86** entstammen aus der LEADQUEST- und **KM05745** aus der MAYBRIDGE-Datenbank. Diese Verbindungen sind bisher noch nicht als Inhibitoren der humanen CAII beschrieben worden.

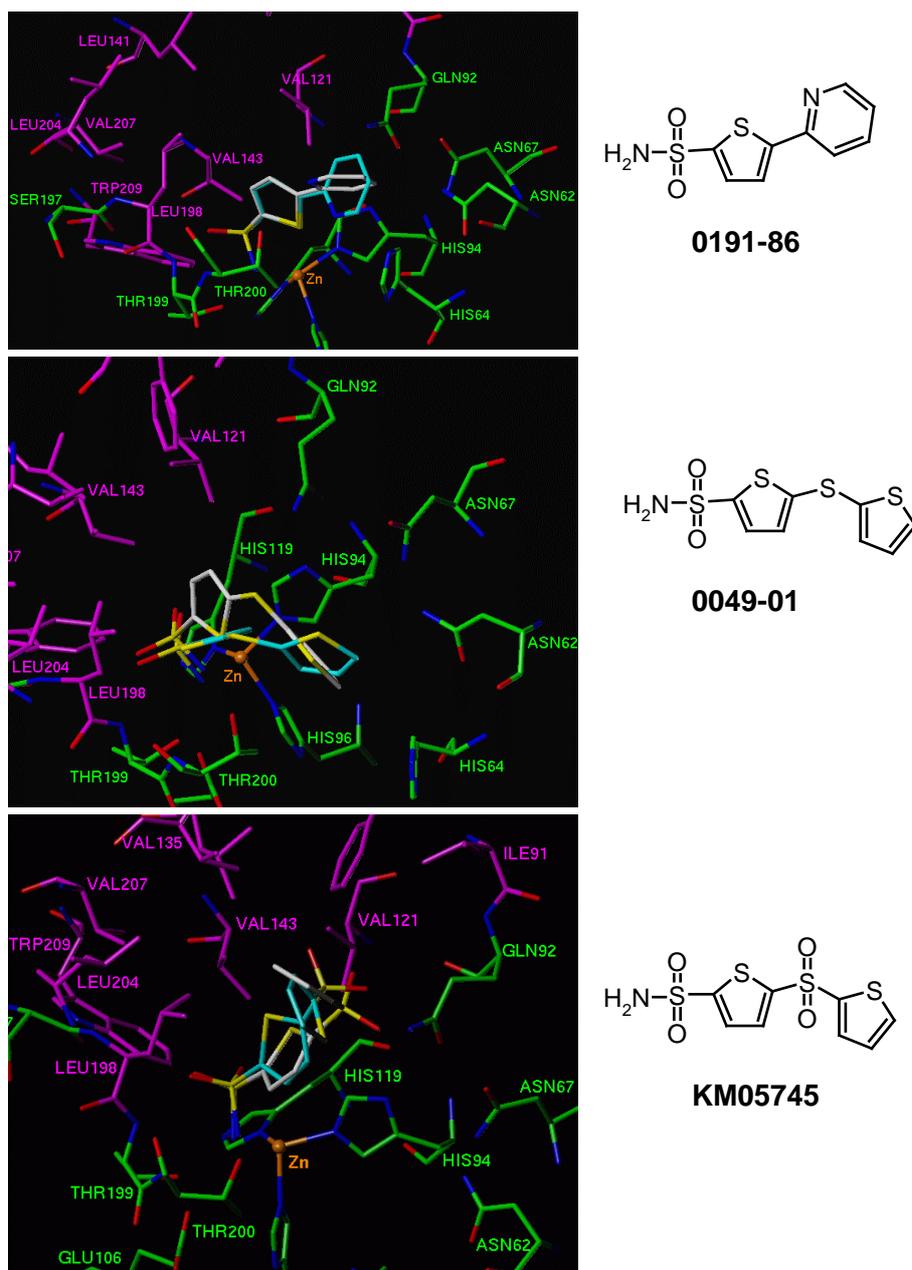


Abbildung 33 Bindetasche der CAII mit den auf Rang 1 bewerteten und eingepaßten Lösungen von FLEXX (hellblau) und DRUGSCORE (weiß) für die Verbindungen **0191-86**, **0049-01** und **KM05745**. Die hydrophoben Aminosäuren der Bindetasche sind grün, die hydrophilen violett gefärbt.

Die vorgeschlagenen Plazierungen für **0191-86** durch DRUGSCORE (FLEXX-Vorschlag 13) und FLEXX unterscheiden sich nur in der Drehung des Pyrimidin-Ringes um 90° in *para*-Stellung zur Sulfonamidgruppe (Abbildung 33). Sowohl bei **0049-01** wie auch bei **0191-86** gehen die Verbindungen in allen diskutierten Bindungsmodi hydrophobe Wechselwirkungen ein, abgesehen von den bekannten Wechselwirkungen der Sulfonamidgruppe mit dem Zink und Thr-199. Dennoch unterscheidet sich der Bindungsmodus von DRUGSCORE (FlexX-Lösung 182) von dem, der durch FLEXX am besten bewertet wird. Der vordere der beiden über Schwefel verbrückten Thiophenringe (ausgehend von dem Zinkatom) liegt im Gegensatz zur FLEXX-Lösung 90° gedreht vor und ist somit in der Lage mit Leu-198 hydrophobe Wechselwirkungen einzugehen.

Der vordere der beiden über eine Sulfonylgruppe verbrückte Thiophenring der Verbindung **KM05745** zeigt bei beiden Vorschlägen (DRUGSCORE entspricht FLEXX-Lösung 34) eine hydrophobe Wechselwirkung mit der Seitenkette von Leu-198. Beide Bindungsmodi schlagen auch eine Wasserstoffbrückenbindung eines Sulfonylsauerstoffatoms mit der Amidgruppe von Gln-92 vor.

Die Wechselwirkungen lassen eine gute Inhibierung erwarten. Werden die berechneten MlogP-Werte für die weitere bei der Beurteilung der Verbindungen in Betracht gezogen, so läßt sich feststellen, daß für **0191-86** mit 0.07 und für **KM05745** mit -0.65 eine befriedigende bis gute Wasserlöslichkeit zu erwarten ist. Bei **0049-01** hingegen wird der überwiegend hydrophobe Charakter durch einen errechneten MlogP von 1.0 bestätigt. Sollte dieses Molekül sich als potenter Inhibitor erweisen, so wären strukturelle Änderungen durch das Hinzufügen hydrophiler Substituenten an die Thiophenringe denkbar, um so seine Wasserlöslichkeit zu erhöhen.

3.1.9.5 Weitere sulfonamidische Vorschläge

Verbindung **2000-00801**, bestehend aus zwei Benzolsulfonamiden, die durch eine Sulfonylgruppe verbrückt sind, wurde ebenfalls aus der LEADQUEST-Datenbank selektiert.

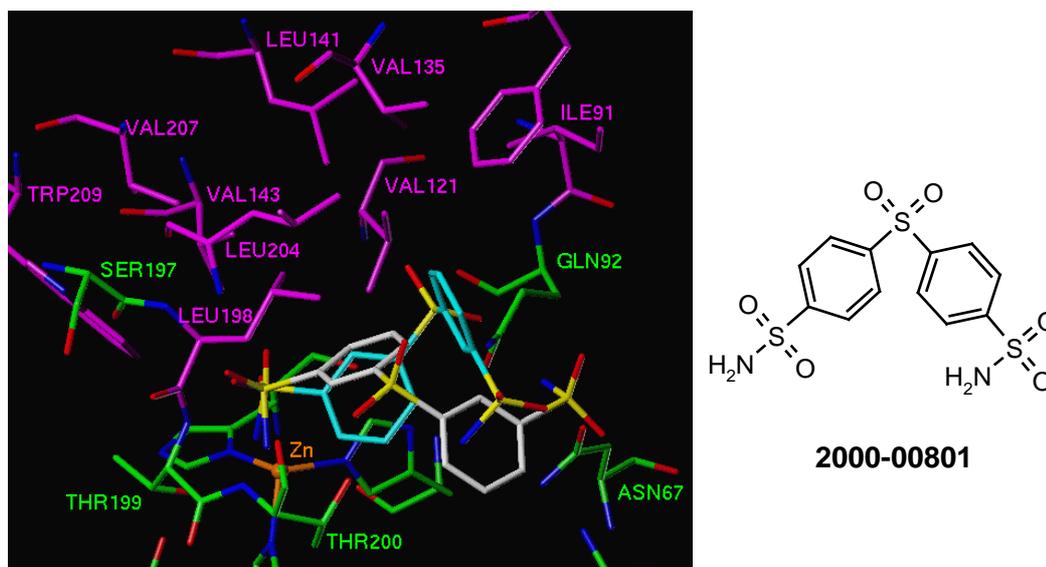


Abbildung 34 Bindetasche der CAII mit den auf Rang 1 bewerteten und eingepaßten Lösungen von FLEXX (hellblau) und DRUGSCORE (weiß) für die Verbindungen **2000-00801**. Die hydrophoben Aminosäuren der Bindetasche sind grün, die hydrophilen violett gefärbt.

Der von DRUGSCORE (FLEXX-Vorschlag 45) bewertete Bindungsmodus zeigt eine hydrophobe Wechselwirkung des vorderen Benzolringes (von der Zink gebundenen Sulfonamidgruppe ausgehend) mit Leu-198. Eines der beiden Sulfonylsauerstoffatome bildet bei diesem Vorschlag eine Wasserstoffbrückenbindung mit der Hydroxylgruppe des Thr-200 (3.1Å). Ein Sauerstoffatom der endständigen nicht an Zink gebundenen Sulfonamidgruppe bildet eine gerichtete Wechselwirkung mit der Amidgruppe von Gln-92. Der FLEXX-Vorschlag wird durch die Wasserstoffbrückenbindungen des Sulfonylsauerstoff mit Gln-92 und dem Stickstoffatom der endständigen Sulfonamidgruppe mit dem Sauerstoff von Pro-201 bestimmt. Der errechnete MlogP von -0.48 läßt eine gute Löslichkeit der Verbindung erwarten und die Auswertung der Bindungsmodi sprechen für eine hohe Affinität dieser Verbindung.

3.1.9.6 Hydroxamate

Für Vergleichszwecke, vor allem um eine andere Zink-bindende Gruppe mit in die Vorschläge einzubringen, wurden auch Hydroxamate berücksichtigt. Bei ihrer Auswahl gelten ähnliche Anforderungen, wie bei den Sulfonamiden in Bezug auf die direktionale Wechselwirkungen in der Bindetasche. Wird allerdings der in Kapitel 1.4.6 für Hydroxamate beschriebene Bindungsmodus berücksichtigt, werden besondere Anforderungen an die Verbindungen gestellt. Bei größeren Verbindungen als z.B. Trifluoracetohydroxamsäure können aus sterischen Gründen direkt nach der Ankergruppe keine sterisch anspruchsvollen bzw. starren Molekülbausteine folgen. Bausteine, wie z.B. eine Methylgruppe, erlauben an dieser Position eine höhere Flexibilität. Diese Flexibilität ist notwendig, um im weiteren Aufbau der Molekülstruktur, ausgehend von der Zink-bindenden Hydroxamatgruppe, funktionelle Gruppen anfügen zu können, ohne in sterischen Konflikt mit der Bindetasche zu kommen. Wie die Berechnung der SimIndices (Kapitel 3.1.1), die Suchen mit dem sulfonamidischen Fragment bei RIGFIT und die Überlagerungen mit FLEXS anhand der sulfonamidischen Referenzstrukturen verdeutlicht haben, wurden Hydroxamate insgesamt mit einem „schlechten“ Ähnlichkeitsmaß/SimIndex bewertet. Die Auswahl der Vorschläge fand deshalb durch eine gezielte Suche nach Hydroxamaten über die Grenzen der 100 ausgewerteten Verbindungen bei der mit FLEXS durchgeführten Überlagerungen hinaus statt.

0164-08 und **KM01987** entsprechen den oben beschriebenen Anforderungen. Mit MlogP Werten von 0.43 für **0164-08** und -0.36 für **KM01987** wird eine ausreichende bis gut Wasserlöslichkeit der Verbindungen vorhergesagt. Das Einpassen der Verbindungen mit FLEXX in die Bindetasche (Docking) wurde analog zu den Sulfonamiden mit dem *MapRef*-Modus durchgeführt. Hierbei diente das Hydroxamatfragment, der im Komplex mit der humanen CAII strukturell bestimmten Acetohydroxamsäure (PDB-Code: 1AM6) als Referenzfragment (siehe auch Testdatensatz Tabelle 2).

Aufgrund der sehr restriktiven Vorgabe durch das Referenzfragment wurden von FLEXX bei **0164-08** nur eine und bei **KM01987** nur zwei Bindungsmodi erzeugt (Abbildung 35).

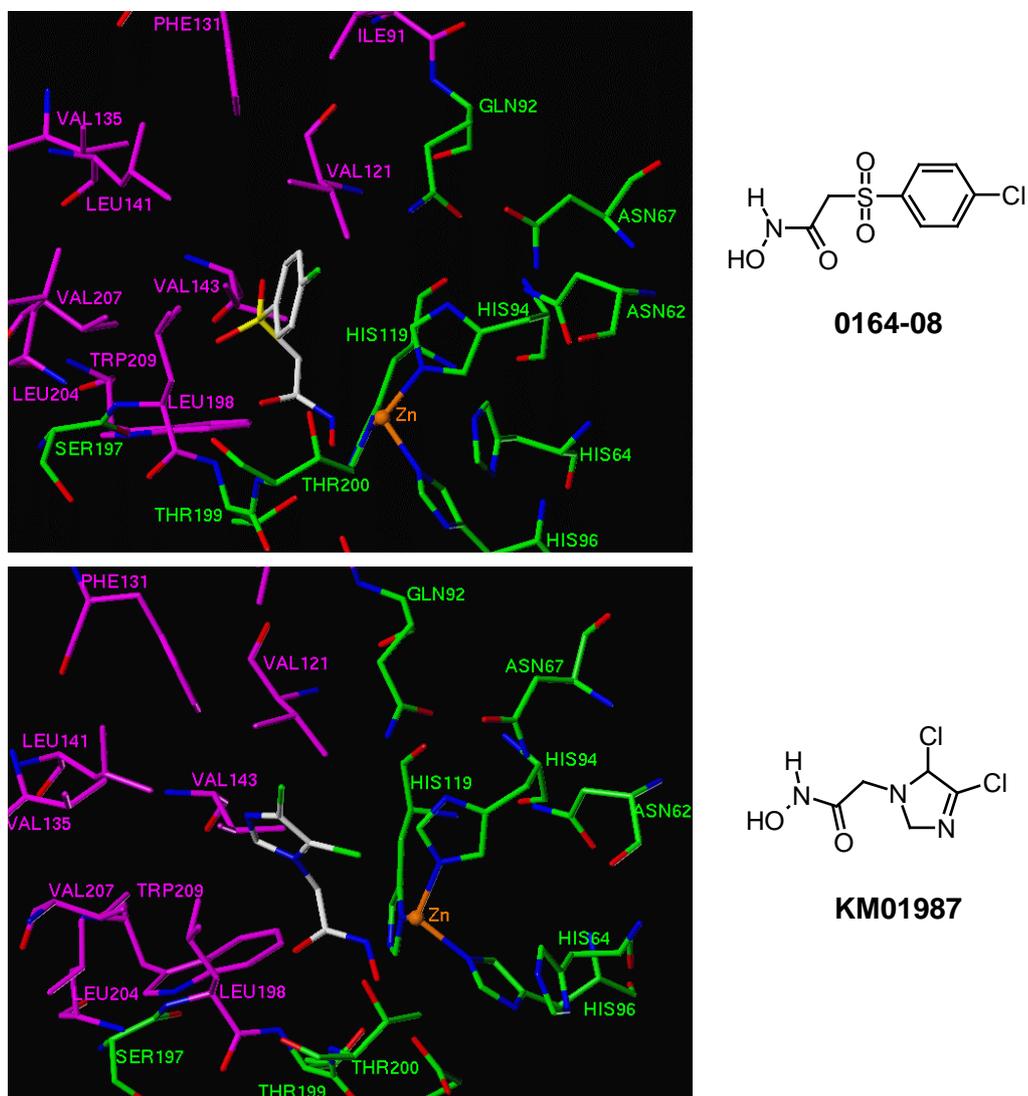


Abbildung 35 Bindetasche der CAII mit der eingepaßten Lösung von FLEXX (weiß) für die Verbindungen **0164-08** und **KM01987**. Die hydrophoben Aminosäuren der Bindetasche sind grün, die hydrophilen violett gefärbt.

Der deprotonierte Stickstoff der Hydroxamatgruppe wechselwirkt mit dem Zinkatom (1.9\AA), und das Sauerstoffatom der Hydroxamatgruppe bildet eine Wasserstoffbrücke mit der Hydroxylgruppe von Thr-199 (2.1\AA). Der Carbonylsauerstoff der Hydroxamatgruppe bildet ebenfalls eine gerichtete Wechselwirkung in Form einer Wasserstoffbrücke mit dem peptidischen Rückgrat Stickstoffatom von Thr-199 (2.6\AA). Die Sulfonylgruppe ist in den hydrophoben Bereich der Bindetasche (Val-207, Val-143, Val-121) orientiert. Der Chlorphenylring wechselwirkt mit der Seitenketten von Leu-

198 und das Chloratom ist ohne Wechselwirkungen mit der Tasche zum Lösungsmittel hin orientiert. Ähnlich orientiert sind auch die beiden Chloratome des Dichlorimidazolringes von **KM01987**. Die Wechselwirkungen und Bindungsabstände entsprechen denen der Hydroxamatgruppe von **0164-08**. Der Dichlorimidazolring ist so orientiert, daß hydrophobe Wechselwirkungen mit der Seitenkette von Leu-198 bestehen und die Chloratome aus der Tasche heraus zum Lösungsmittel hin ragen. Die zweite für **KM01987** erhaltene Konformation unterscheidet sich nur geringfügig in den Abständen der Hydroxamatgruppe und zeigt keine Änderung in der Orientierung des Dichlorimidazolringes.

Abschließend läßt sich bei diesen beiden Verbindungen feststellen, wenn der in der Kristallstruktur bestimmte Bindungsmodus der Hydroxamate auch bei diesen Verbindungen als Voraussetzung für eine effektive Inhibierung gilt, werden diese Hydroxamate wahrscheinlich eine schwache Affinität besitzen.

3.1.10 Allgemeine Analyse der Vorschläge

Analog zu den Analysen des Testdatensatzes (Kapitel 3.1.1) wurden auch die genannten Vorschläge untersucht, um einen Überblick über die vorhandene Diversität und die Qualität der Vorschläge zu erhalten.

Das Molekulargewicht der vorgeschlagenen Verbindungen liegt im Bereich zwischen 201D und 385D, der berechnete MLogP (Moriguchi *et al.*, 1994; Moriguchi *et al.*, 1992) variiert von -0.65 bis 1.3. Als Maß für die Flexibilität wurde die Anzahl der drehbaren Bindungen bestimmt, die zwischen 3 und 9 lag. Die Anzahl der Wasserstoffbrückenakzeptoren pro Verbindung variiert zwischen 2 und 6, die der H-Brückendonoren zwischen 1 und 3. Ein weiterer Deskriptor für die Diversität eines Datensatzes ist die Ähnlichkeit der Vorschläge zu einer Referenzstruktur. Es wurde hierbei ebenfalls der bereits in Kapitel 1.5.2 beschriebene Tanimoto-Koeffizient (Similarity Index)^a berechnet. Als Referenzstrukturen wurden analog zu der Analyse des Testdatensatzes jeweils Dorzolamid bzw. Acetazolamid gewählt. In Abbildung 36 sind die Verteilungen der von UNITY berechneten SimIndizes (Kapitel 2.3.1) dargestellt. Die Normalverteilung für Dorzolamid als Referenz zeigt, daß der überwiegende Teil der Strukturen einen SimIndex zwischen 20% und 45% aufweist, bei Acetazolamid liegt der Bereich zwischen 10% und 30%. Legt man auch hier den in Kapitel 1.5.2 beschriebenen Tanimoto-Koeffizienten von 0.85 (vergleichbarer SimIndex bei 85%) für die Auswertung dieser Ergebnisse zu Grunde, so zeigt sich, daß beide Verteilungen eine deutliche Diversität zu den bereits bekannten Wirkstoffen

^a Tanimotokoeffizient (0.0-1.0) wird in Unity als Similarity Index (SimIndex) von 0 bis 100 angegeben.

aufweisen. Dies eröffnet die Perspektive auf möglicherweise neue Leitstrukturen. Ein im Anschluß durchgeführter *in vitro* Enzymassay sollte zeigen, welche der vorgeschlagenen Verbindungen, eine Affinität bzw. inhibitorische Wirkung besitzt.

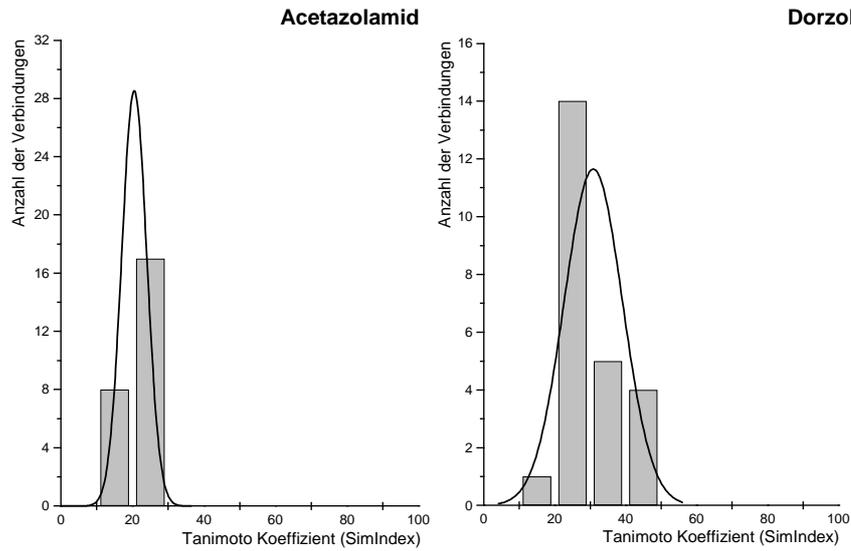
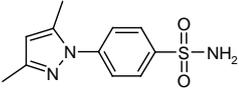
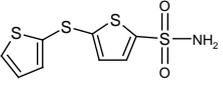
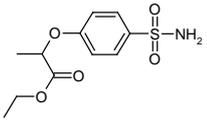
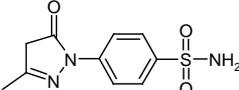


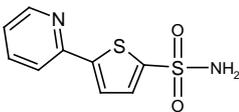
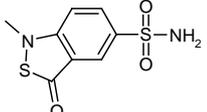
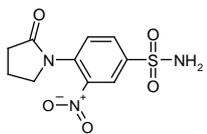
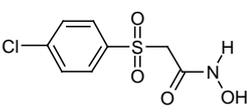
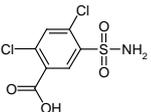
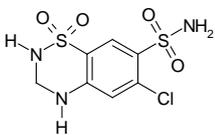
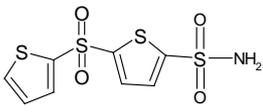
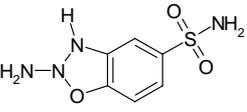
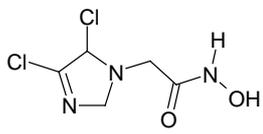
Abbildung 36 Normalverteilung der Ähnlichkeitsindizes der vorgeschlagenen potentiellen Inhibitoren von Dorzolamid **5** und Acetazolamid **1**.

3.2 IC₅₀-Werte der vorgeschlagenen Verbindungen

Zur Überprüfung der inhibitorischen Wirkung der vorgeschlagenen Verbindungen wurde der mit dem in Kapitel 2.1.4.1 beschriebenen Enzymassay die IC₅₀-Werte der Verbindungen bestimmt. Nicht lieferbar waren die folgenden vier Verbindungen: **2000-01524**, **2000-00801**, **2000-06688**, **NRB00993**, Verbindung **2000-02109** war unter den gegebenen Bedingungen des Enzymassays nicht löslich. Diese Beobachtung überrascht auf den ersten Blick, denn für dieses Sulfonamid mit einer Carboxygruppe ist wegen seiner Polarität eine gute Löslichkeit zu erwarten. Denkbar wäre allerdings, daß die Verbindung gerade wegen ihres Aufbaus ein günstiges Kristallgitter bildet, was zu einer schlechten Wasserlöslichkeit führt. Damit verblieben insgesamt 13 Verbindungen mit denen eine IC₅₀-Bestimmung durchgeführt werden konnte. Die Ergebnisse dieser IC₅₀-Bestimmung sind in Tabelle 6 aufgeführt.

Tabelle 6 *Ergebnisse der IC₅₀-Bestimmung von 13 als neue Inhibitoren der humanen Carboanhydrase II vorgeschlagenen Verbindungen mit den von DRUGSCORE errechneten pIC₅₀-Werten.*

Verbindung	Kennzeichnung	pIC ₅₀ (calc.)	pIC ₅₀ (exp.)	Datenbank
	0009-46	6.92	7.67	LeadQuest
	0049-01	8.38	9.05	LeadQuest
	0076-89	9.11	6.73	LeadQuest
	0114-01	7.87	6.31	LeadQuest

	0191-86	7.90	6.93	LeadQuest
	0134-36	8.04	6.61	LeadQuest
	2000-07790	8.23	9.21	LeadQuest
	0164-08	-	(>1mM)	LeadQuest
	2000-01951	6.54	6.77	LeadQuest
	JFD00715	6.93	5.26	Maybridge
	KM05745	7.62	9.09	Maybridge
	NRB01507	7.37	5.64	Maybridge
	KM01987	-	(>1mM)	Maybridge

Zur Beurteilung der Vorhersagequalität der eingesetzten Programme FLEXX bzw. DRUGSCORE im Hinblick auf die erhaltenen Affinitätsvorhersagen wurden die gemessenen und logarithmierten IC₅₀-Werte der neuen Inhibitoren und einiger Testdatensatzverbindungen (Tabelle 2), deren IC₅₀-Werte bereits in der Literatur

publiziert worden sind, mit den Scoringwerten von DRUGSCORE korreliert. Ausgehend von dem durch FLEXX erzeugten und mit DRUGSCORE bewerteten „besten Bindungsmodus“ der jeweiligen Verbindung wurde mit Hilfe einer achsenabschnittslosen linearen Regression die berechneten bzw. gemessenen und logarithmierten IC_{50} -Werte (pIC_{50} -Werte) korreliert (Abbildung 37). Die Hinzunahme der Testdatensatzverbindungen begründet sich mit einer größeren Zahl an Verbindungen, die insgesamt eine bessere Korrelation der pIC_{50} -Werte ermöglichen.

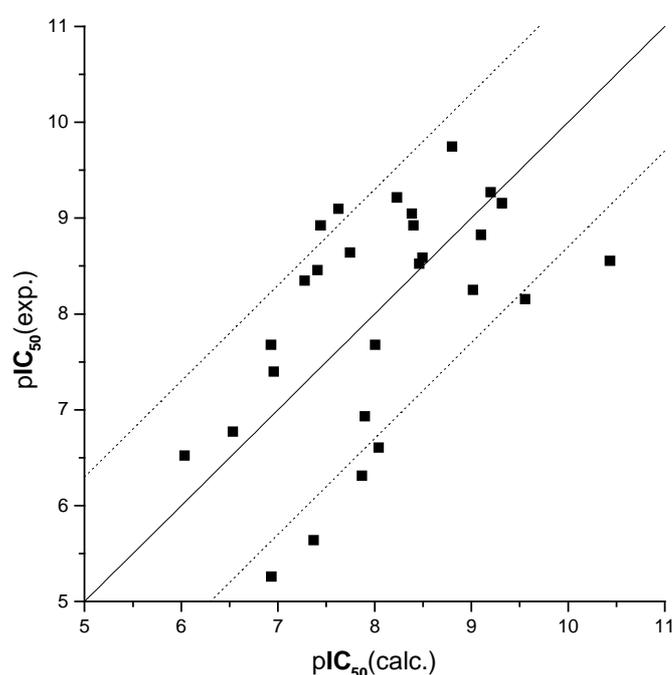


Abbildung 37 Korrelation der experimentellen IC_{50} -Werte der Inhibitoren aus Tabelle 6 und der aus Tabelle 2 stammenden Verbindungen, deren IC_{50} -Werte publiziert sind, mit den von DrugScore errechneten $pIC_{50}(cal.)$ -Werten.

Aufgrund einer sehr hohen Abweichung (>1.3 log-Einheiten)^a des berechneten pIC_{50} -Wertes (9.11) vom experimentellen pIC_{50} -Wert (6.73) bei Verbindung **0076-89** und starken Abweichungen bei der Testdatensatzverbindung Acetazolamid (**AZM**) mit einem berechneten pIC_{50} -Werte von 8.46 und einem experimentellen pIC_{50} -Wert von 6.21 wurden beide Verbindungen aus der Korrelation herausgelassen. Die Standardabweichung der Korrelation der übrigen 27 Verbindungen betrug nur 0.9 logarithmische Einheiten, der Korrelationskoeffizient r^2 lag bei 0.31, was einer mäßigen

^a Allgemein werden Fehlergrenzen von 1.3 logarithmischen Einheiten (Böhm, 1998) bzw. 10-15%igen Abweichung bei der Vorhersage der ΔG^0 -Werte als Bereich der Vorhersagegenauigkeit beschrieben (Tame, 1999). (Kapitel 1.5.5).

Korrelation entspricht. Mit DRUGSCORE wurde ein Vorfaktor von -0.78 ermittelt (Kapitel 2.4.2), der zur Vorhersage der Bindungsaffinitäten der Inhibitoren verwendet wurde.

Die Ergebnisse des *in vitro*-Enzymassay zeigen, daß drei subnanomolare Verbindungen (**0049-01**, **2000-07790**, **KM05745**), eine nanomolare Verbindung (**0009-46**), fünf submikromolare Verbindungen (**0076-89**, **0114-01**, **0191-86**, **2000-01951**, **0134-36/BTB03218**) und zwei mikromolare Verbindungen (**NRB01507**, **JFD00715**) durch die computergestützten Suchen selektiert werden konnten. Bei den Verbindungen **KM01987** und **0164-08** (Hydroxamate) konnte keine inhibitorische Wirkung gemessen werden.

Die Diskussion der Struktur-Affinitätsbeziehung einzelner Verbindungen ist im allgemeinen ohne die Kenntnis einer Kristallstruktur des Protein-Ligand-Komplexes schwierig. Für zwei Verbindungen **2000-07790** und **0134-36/BTB03218** ist es jedoch gelungen Komplexstrukturen zu erhalten. Die strukturellen Erkenntnisse aus diesen dort erhaltenen Bindungsmodi im Zusammenhang mit den für diese Verbindungen gemessenen Bindungsaffinitäten werden in den folgenden Kapiteln diskutiert.

Werden mehrere teilweise strukturell stark unterschiedliche Verbindungen getestet, so ist es im allgemeinen schwierig, Erkenntnisse zu gewinnen, die eine Abstufung der Affinität anhand der Strukturen erklären. Bei den hier erfolgreich getesteten Verbindungen kommen dagegen zwei Gruppen mit strukturell ähnlichen Verbindungen vor, zum einen die *para*-substituierten Benzolsulfonamide **0009-46** und **0114-01** und zum anderen die Thiophensulfonamide **0049-01** und **KM05745**. Ein struktureller Unterschied zwischen **0009-46** und **0114-01** besteht einzig in der Substitution und Absättigung des Pyrazolringes. **0009-46** ist an Position 5 methyliert, während **0114-01** an gleicher Position eine Carbonylfunktion trägt. Die gemessene Affinität von **0009-46** ist ungefähr eine logarithmische Einheit höher als die von **0114-01**. Anhand dieser Affinitätsabstufung läßt sich vermuten, daß in der amphiphilen Bindetasche der humanen CAII der hydrophobe Bindungsanteil im Bereich des Pyrazolringsystems gegenüber einer potentiellen Wasserstoffbrückenbindung überwiegt.

Der strukturelle Unterschied der Thiophensulfonamide besteht in dem Oxidationsgrad des die Thiophenringe verbrückenden Schwefels. Die Thiophenringe werden bei **0049-01** durch eine Sulfonylgruppe und bei **KM05745** durch ein Schwefelatom (Thioether) verbrückt. Bei beiden Verbindungen wurden vergleichbar hohe Affinitäten gemessenen. Es stellt sich hierbei allerdings die Frage, wieso diese beiden Verbindungen annähernd gleiche Affinitäten besitzen? Betrachte man zunächst den Bindungsmodus von Dorzolamid **5** und dabei insbesondere die Wechselwirkungen eines der beiden Sulfonylsauerstoffatome mit der Amidgruppe von Gln-92 (Kapitel 1.4.2 Abbildung 5),

so läßt sich diese gerichtete Wechselwirkung auch für die Sulfonylgruppe von **0049-01** erwarten. Unterstützt wird diese Vermutung durch die von DRUGSCORE und FLEXX als „beste“ Lösungen bewerteten Bindungsmodi. Diese gerichtete Wasserstoffbrückenbindung ist, verglichen mit den ausschließlich hydrophoben Wechselwirkungen von **KM05745**, jedoch entropisch ungünstig. Durch die nicht vorhandene gerichtete Wechselwirkung bei **KM05745** besteht die Möglichkeit andere (günstigere) hydrophobe Wechselwirkungen einzugehen, die vermutlich additiv gleichwertig zu den Wechselwirkung von **0049-01** sind.

3.3 Strukturelle Validierung der vorgeschlagenen Bindungsmodi

Die im Enzymassay charakterisierten Vorschläge (Kapitel 3.2) wurden zum „Soaking“ in die Kristalle der humanen CAII eingesetzt (Kapitel 0), um Hinweise über ihre tatsächlichen Bindungsmodi zu erhalten, und um die durch die Programme FLEXX und DRUGSCORE vorhergesagten Bindungsmodi zu überprüfen. Erfolgreich war das Soakingexperiment bei zwei Verbindungen. Trotz der begrenzten Zahl an gewachsenen Proteinkristallen gelang für die zwei Verbindungen **0134-36/BTB03218** und **2000-07790** eine röntgenkristallographische Untersuchung der Komplexstrukturen. Gründe für die geringe Zahl an Proteinkristallen sind in den fehlgeschlagenen Soakingexperimenten, bei denen die Kristalle zerstört wurden bzw. nur zu einer ausreichenden Streuqualität führten, zu sehen, sowie in der eingeschränkten Löslichkeit der neuen Inhibitoren.

3.3.1 Kristallographische Charakterisierung des 0134-36/BTB03218-CAII-Komplexes

Die Koordinaten der *apo*-HCAII (2CBA, 1.54Å) wurden verwendet, um die Phasen für eine Fouriertransformation festzulegen und damit die Elektronendichte bzw. Differenzelektronendichten zu berechnen (Kapitel 2.2.4). Die erreichte Auflösung der Kristallstruktur beträgt 2.3Å. Die Daten der Verfeinerung sind in Tabelle 7 aufgeführt.

Die Auswertung der Komplexstruktur ergab die folgenden Wasserstoffbrücken bzw. koordinativen Bindungen zwischen **0134-36/BTB03218** und den Resten der Bindetasche: zwischen dem Zinkatom der humanen CAII und dem sulfonamidischen Stickstoff des Inhibitors (1.8Å), dem Hydroxylsauerstoff von Thr-199 und dem sulfonamidischen Stickstoff des Inhibitors (2.9Å), der NH-Gruppe von Thr-199 und einem der sulfonamidischen Sauerstoffatome (2.9Å) des Inhibitors und der Amidgruppe von Gln-92 und dem Carbonylsauerstoff des Thiazolinonringes (2.8Å) (Abbildung 38).

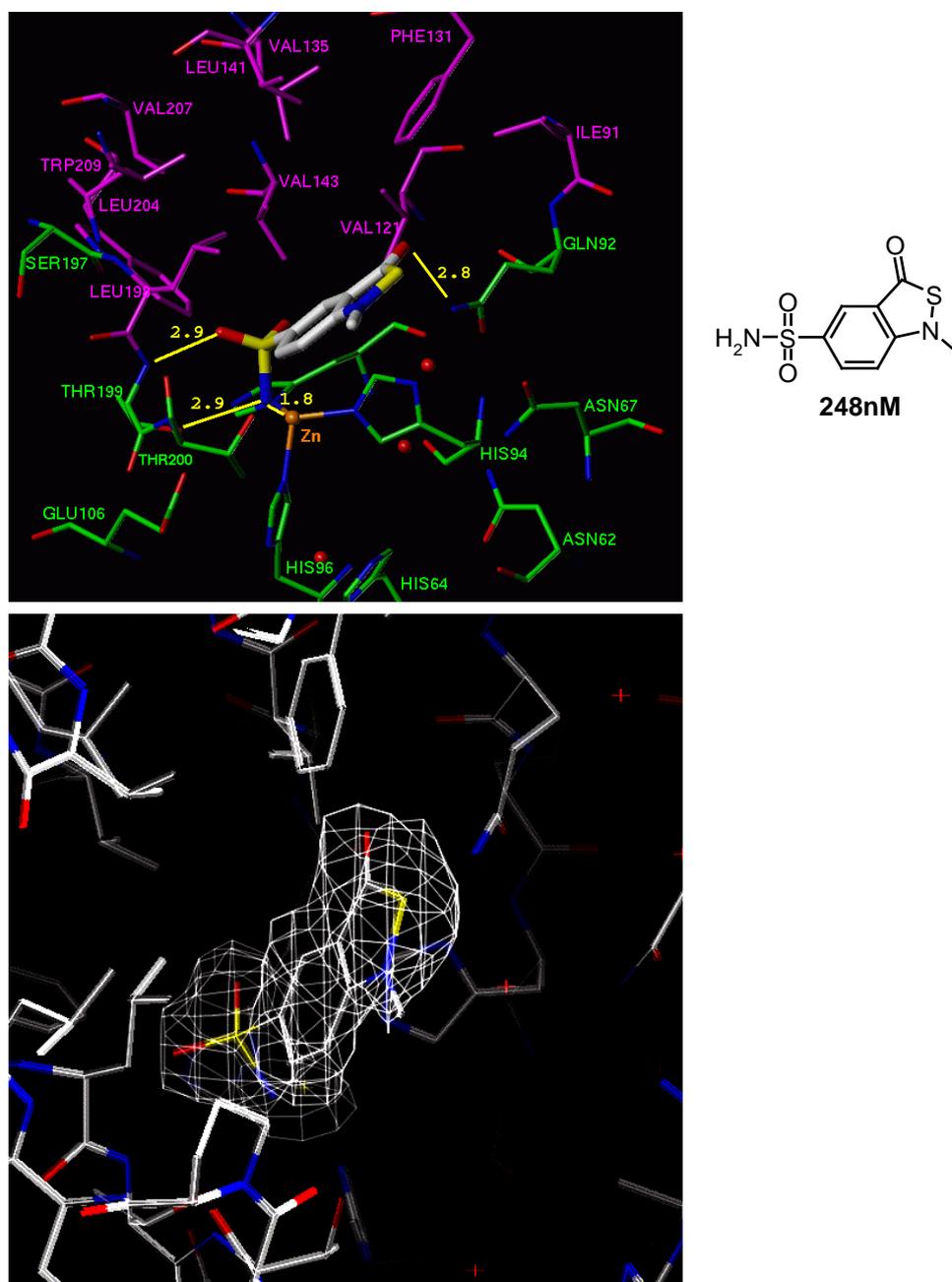


Abbildung 38 Kristallstruktur der humanen CAII in Komplex mit **0134-36/BTB03218** bei einer Auflösung von 2.3Å. Die $2F_o-F_c$ -Dichte um den Inhibitor ist als Netz zu sehen, wobei auf einen Niveau von 1.0 σ konturiert wurde. Die Abbildung oben zeigt die Bindetasche der CAII mit dem Inhibitor und den in der Bindetasche identifizierten gerichteten Wechselwirkungen. Die hydrophoben Aminosäuren der Bindetasche sind grün, die hydrophilen violett gefärbt.

Tabelle 7 *Datensammlung und Verfeinerung des Komplexes von humaner CAII mit 0134-36/BTB03218.*

	CAII- 013436/BTB03218
Raumgruppe	P2(1)
Zellkonstanten	
a (Å)	42.56
b (Å)	41.40
c (Å)	72.34
α (deg)	90.0
β (deg)	104.0
γ (deg)	90.0
Auflösungsbereich (Å)	10-2.3
Zahl der unabhängigen Reflexe	10124
Vollständigkeit der Daten	95.2
R_{free}^a (%)	26.9
R-Faktor ^a (%)	19.5
Zahl der Wassermoleküle	122
Zahl der Zinkatome	1
Zahl der Quecksilberatome	1
RMS-Abweichung, Winkel (deg)	1,443
RMS-Abweichung, Bindungen (Å)	0,008

^a Der R_{free} -Faktor wurde aus einer zufälligen Anzahl von Reflexen aus ~10% der Daten berechnet; der R-Faktor wurde mit den Intensitäten der verbleibenden Daten berechnet.

Ein Vergleich der durch FLEXX und DRUGSCORE vorgeschlagenen „besten“ Bindungsmodi (Kapitel 3.1.9.1) mit der Kristallstruktur zeigt, daß DRUGSCORE in der Vorhersage des Bindungsmodus näher an der experimentellen Struktur liegt. Dies bestätigt auch ein Vergleich der RMS-Werte. Die „beste“ Lösung von FLEXX weist eine RMS-Abweichung von 2.2Å, die „beste“ Lösung von DRUGSCORE hingegen ein RMS-Abweichung von 1.2Å von der Kristallstruktur auf.

Das bizyklische System ist bei der DRUGSCORE-Lösung (FLEXX-Lösung 51) jedoch etwas stärker in Richtung der hydrophoben Aminosäuren Leu-198 und Leu-204 orientiert und somit nicht in der Lage, eine gerichtete Wechselwirkung mit der Amidgruppe von Gln-92 aufzubauen, wie diese in der Kristallstruktur zu beobachten

ist. Hierbei präferiert die Scoringfunktion von DRUGSCORE offensichtlich ein solche Plazierung bei der eher lipophile Wechselwirkungen des Liganden die Bindung bestimmen.

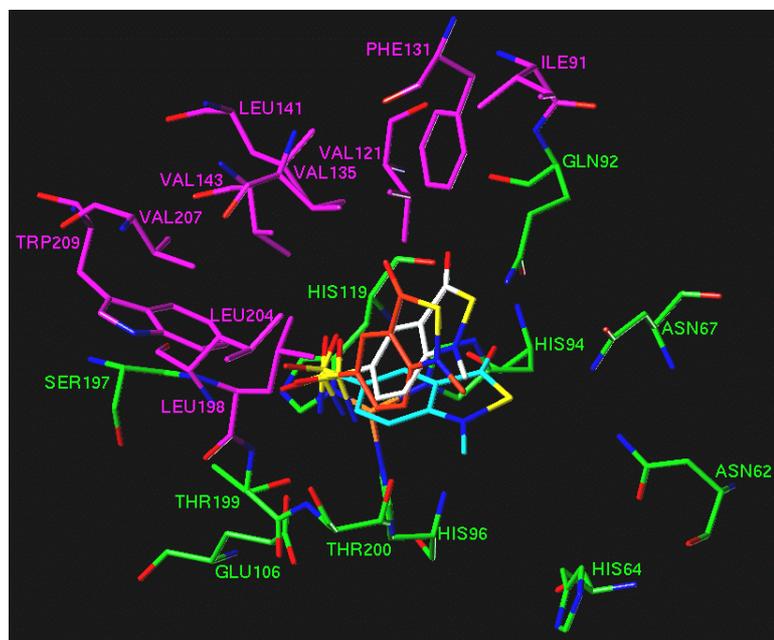


Abbildung 39 Darstellung der Bindetasche der CAII mit den "besten" Vorschlägen der Bindungsmodi von FLEXX (hellblau), DRUGSCORE (weiß) und der Kristallstruktur (orange) für **0134-36/BTB03218**. Die hydrophoben Aminosäuren der Bindetasche sind grün, die hydrophilen violett gefärbt.

3.3.2 Kristallographische Charakterisierung des 2000-07790-CAII-Komplexes

Auch hier wurden die Koordinaten der *apo*-HCAII (2CBA, 1.54Å) eingesetzt, um die Phasen für eine Fouriertransformation festzulegen und damit die Elektronendichte bzw. Differenzelektronendichten zu berechnen (Kapitel 2.2.4). Die erreichte Auflösung der Kristallstruktur beträgt 2.4Å. Die Daten der Verfeinerung sind in Tabelle 8 aufgeführt.

Bei dieser Kristallstruktur lagen die folgenden Wasserstoffbrücken bzw. koordinativen Bindungen vor: zwischen dem Zinkatom der humanen CAII und dem sulfonamidischen Stickstoff des Inhibitors (1.8Å), dem Hydroxylsauerstoff von Thr-199 und dem sulfonamidischen Stickstoff des Inhibitors (3.3Å), der NH-Gruppe von Thr-199 und einem der sulfonamidischen Sauerstoffatome (3.1Å) des Inhibitors und einem Protein-gebundenen Wassermolekül und dem Carbonylsauerstoffatom des Pyrrolidinonringes (3.3Å) (Abbildung 40).

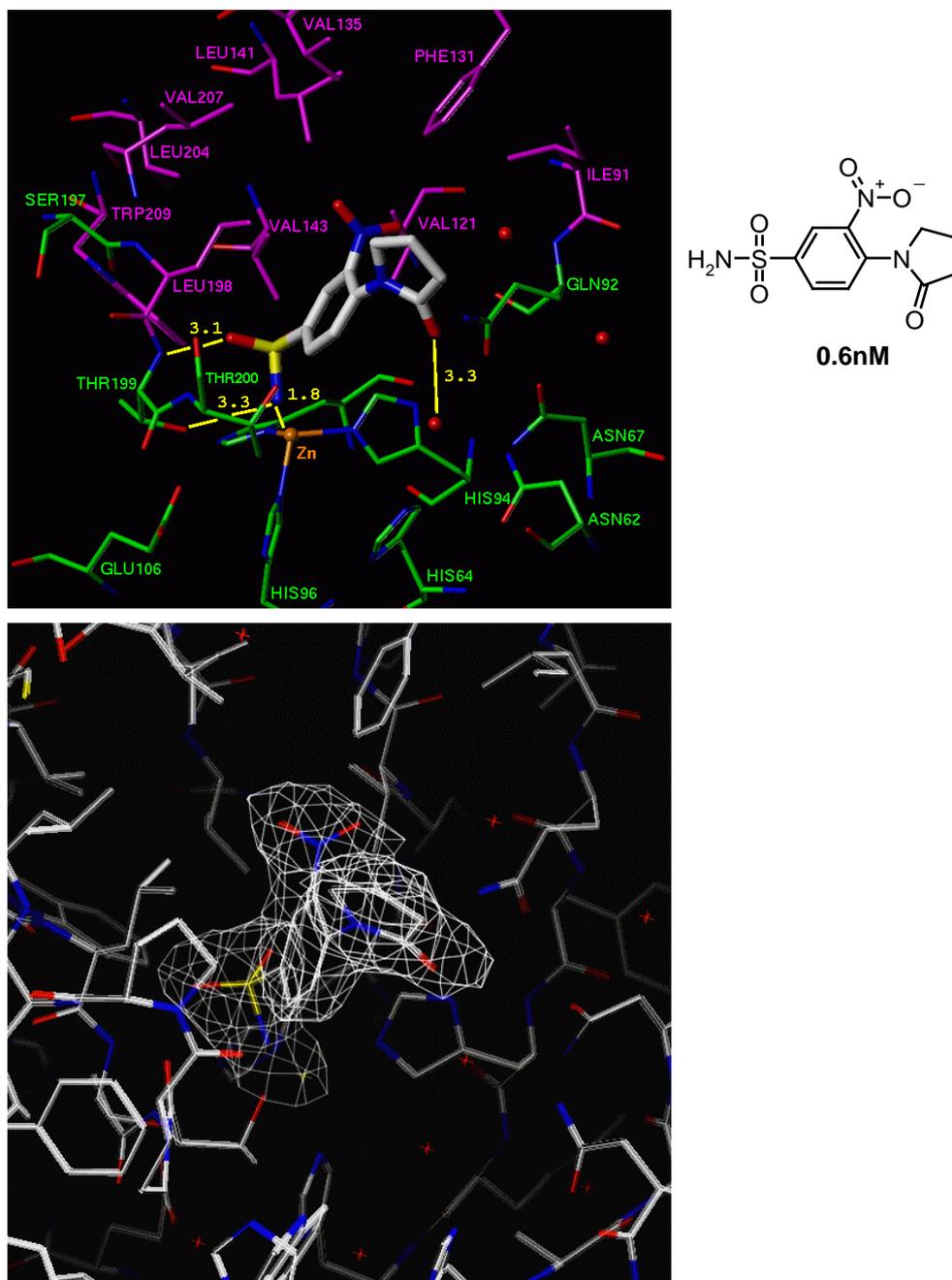


Abbildung 40 Kristallstruktur der humanen CAII in Komplex mit **2000-07790** bei einer Auflösung von 2.4Å. Die $2F_o-F_c$ -Dichte um den Inhibitor ist als Netz zu sehen (konturiert auf 1.0σ). Konturoberfläche bei. Die Abbildung auf der rechten Seite zeigt die Bindetasche der CAII mit dem Inhibitor und den in der Bindetasche identifizierten gerichteten Wechselwirkungen. Die hydrophoben Aminosäuren der Bindetasche sind grün, die hydrophilen violett gefärbt.

Tabelle 8 *Datensammlung und Verfeinerung des Komplexes von humaner CAII mit 2000-07790.*

	CAII- 2000-07790
Raumgruppe	P2(1)
Zellkonstanten	
a (Å)	42.69
b (Å)	41.69
c (Å)	72.64
α (deg)	90.0
β (deg)	104.8
γ (deg)	90.0
Auflösungsbereich (Å)	10-2.4
Zahl der unabhängigen Reflexe	8012
Vollständigkeit der Daten	81.3
R_{free}^a (%)	28.3
R-Faktor ^a (%)	19.3
Zahl der Wassermoleküle	118
Zahl der Zinkatome	1
Zahl der Quecksilberatome	1
RMS-Abweichung, Winkel (deg)	1,637
RMS-Abweichung, Bindungen (Å)	0,007

^a Der R_{free} -Faktor wurde aus einer zufälligen Anzahl von Reflexen aus ~10% der Daten berechnet; der R-Faktor wurde mit den Intensitäten der verbleibenden Daten berechnet.

Vergleicht man auch diese Kristallstruktur mit den durch FLEXX und DRUGSCORE vorgeschlagenen „besten“ Bindungsmodi (Kapitel 3.1.9.1), so läßt sich feststellen, daß auch bei diesem Komplex DRUGSCORE aus der Menge der mit FLEXX erzeugten Bindungsmodi eine Geometrie hervorhebt, die der Kristallstruktur deutlich näherkommt als die durch die Scoring Funktion in FLEXX hervorgehobene Platzierung. Dies bestätigt auch hier ein Vergleich der RMS-Werte. Für die „beste“ Lösung von FLEXX konnte eine RMS-Wert von 2.7Å errechnet werden, für die „beste“ Lösung von DRUGSCORE ergab sich ein RMS-Wert von 1.4Å.

Bei der DRUGSCORE-Lösung (FLEXX-Lösung 61) besteht der konformative Unterschied einzig in der Drehung des Pyrrolidinonringes um ca.150°, was einer

Drehung des Substituenten hin zur Mitte der Bindetasche (Abbildung 41) entspricht. Der Grund für diesen Unterschied ist sicherlich in den beim Docking nicht berücksichtigten Wassermolekülen zu sehen, die in diesem Bereich der Bindetasche in der Kristallstruktur vorliegen.

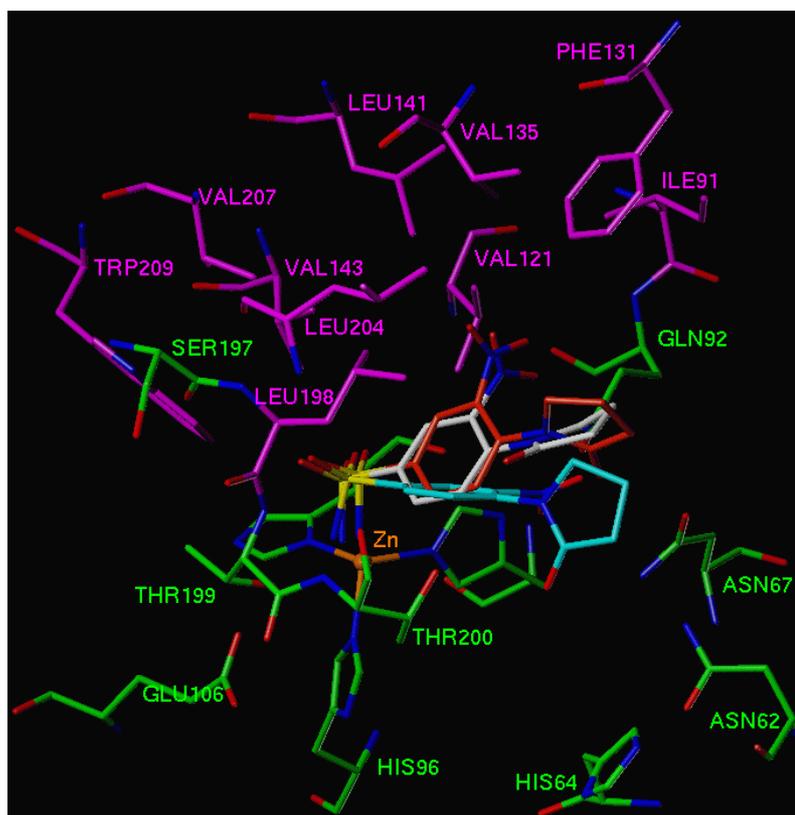


Abbildung 41 Darstellung der Bindetasche der CAII mit den "besten" Vorschlägen der Bindungsmodi von FLEXX (hellblau), DURGSCORE (weiß) und der Kristallstruktur (orange) für **2000-07790**. Die hydrophoben Aminosäuren der Bindetasche sind grün, die hydrophilen violett gefärbt.

Die beiden kristallographisch untersuchten Komplexe unterscheiden sich in ihrer Affinität um den Faktor 400. Es stellt sich nun die Frage, ob sich dieser Unterschied strukturell erklären läßt und welche Faktoren eine Rolle spielen?

Die Inhibitoren und die Bindetasche der humanen CAII sind vor der Bindung vollständig solvatisiert. Bei der Bindung der Inhibitoren müssen sowohl die Inhibitoren als auch das Protein die Wasserhülle abstreifen und der Inhibitor muß zusätzlich noch Wassermoleküle aus der Tasche verdrängen. Hierbei werden dann zahlreiche Wasserstoffbrücken zu Wassermolekülen gebrochen und der Ligand ist in der Lage direkte Wechselwirkungen mit dem Protein einzugehen. Die Bindung eines Inhibitors ist schwach, wenn dieser lediglich fest an das Protein gebundene Wassermoleküle

ersetzt, ohne zusätzliche Wechselwirkungen mit dem Protein einzugehen. Die Verdrängung eines nur schwach gebundenen Wassermoleküls dagegen trägt deutlich zur Bindung bei, da sowohl entropische als auch enthalpische Faktoren diesen Prozeß begünstigen. In der amphiphilen Bindetasche der humanen CAII sind entlang der hydrophoben Seite mehrere leicht verdrängbare Wassermoleküle lokalisiert, wie die Auswertung der *apo*-Kristallstrukturen (PDB-Code: 2CBA) zeigt. Berechnet man ausgehend von der Connollyoberfläche der einzelnen Inhibitoren deren Oberflächen, so kommt man zu folgendem Ergebnissen: die errechnete Oberflächen von **2000-07790** beträgt 247\AA^2 und die von **0134-36/BTB03218** 209\AA^2 . Die Verdrängung von Wassermolekülen (Desolvatation) durch einen im Vergleich größeren Liganden stellt einen Entropiegewinn dar (Böhm & Klebe, 1996) und damit verbunden eine verbesserte Bindungsaffinität. Ein Grund, der für eine stärkere Bindung von **2000-07790** spricht. Eine erstaunlich gute Einpassung in eine hydrophobe Subtasche wird bei der Nitrogruppe von **2000-07790** beobachtet. Diese Nitrogruppe ragt in die durch die hydrophoben Seitenketten von Leu-198 und Leu-141, sowie dem Phenylring von Phe-131 gebildete Subtasche hinein, wobei der Phenylring direkt der Nitrogruppe gegenübersteht. Eine vergleichbare hydrophobe Wechselwirkung einer Nitrogruppe läßt sich bei der Bindung eines *para*-Nitrophenyl-Liganden an den Antikörper Fab D2.3 (PDB-Code: 1YEF) (Gigant *et al.*, 1997) beobachten. Aus diesen Beobachtungen ist zu vermuten, daß gerade die Nitrogruppe einen entscheidenden Affinitätsvorteil ausmacht.

Wertet man dagegen den Bindungsmodus von **0134-36/BTB03218** aus, so spricht für die Affinität dieser Verbindung, daß sie insgesamt sehr star ist und somit eine eingeschränkte konformative Flexibilität besitzt, was aus entropischen Gründen als günstig zu werten ist. Zusätzlich zu den sulfonamidschen Wechselwirkungen ist eine gerichtete Wechselwirkung mit der Amidgruppe von Gln-92 positiv zu werten. **2000-07790** besitzt dagegen eine drehbare Bindung, die bei einer Bindung an das Protein „eingefroren“ wird und sich somit auf die Affinität eher ungünstig auswirkt. Günstig wirkt sich allerdings die Wechselwirkung mit einem Wassermolekül aus, so daß zusammengenommen mit den lipophilen Wechselwirkungen der Nitrogruppe eine insgesamt stärkere Bindung von **2000-07790** erklärt werden kann.

Abschließend ist festzustellen, daß bei der Bindung von Inhibitoren in der Bindetasche der humanen CAII, Wassermoleküle durchaus einen entscheidenden Beitrag bei der Bindung leisten. Dockingverfahren sollten deshalb dahingehend weiter ausgebaut werden, daß solche Wassermoleküle bei der Vorhersage von Bindungsmodi mit eingeschlossen werden, die einen Beitrag zur Ligand-Protein-Wechselwirkungen leisten. Bei der Vorhersage der Affinitäten wird für dieses Enzym nur ein schlechter Korrelationskoeffizient erzielt. Gründe hierfür sind zum einen in dem „besonderen“

Bindungsmodus zu suchen, der mit einer koordinativen Bindung der Sulfonamidgruppe an das Zink eine Besonderheit gegenüber anderen Protein-Ligand-Wechselwirkungen darstellt. Diese speziellen Wechselwirkungen müssten bei einer ausreichenden Zahl an Komplexstrukturen gesondert parametrisiert werden, um eine bessere Bewertung durch die Scoringfunktionen zu erhalten. Eine weitere Schwierigkeit besteht in dem amphiphilen Aufbau der Tasche verbunden mit den in Komplexstrukturen beobachteten Wassernetzwerk entlang der hydrophilen Seite der Bindetasche. Hier greift die eingangs erwähnte Problematik, Wassermolekülen bei Einpassen von Liganden in eine Bindetasche zu berücksichtigen.

4 Zusammenfassung und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde am Beispiel der humanen Carboanhydrase II mit computergestützten Such- und Analyseverfahren in Moleküldatenbanken nach neuen Leitstrukturen gesucht.

Ziel und Motivation dieser Arbeit bestanden in der Entwicklung von Suchstrategien zum *virtuellen Screening* nach neuen potentiellen Wirkstoffen. Die Testung und Weiterentwicklung bestehender und neuer Computermethoden, sowie die abschließende experimentelle Validierung durch *in vitro*-Testung und röntgenkristallographische Strukturanalyse von Protein-Ligand-Komplexen der durch die angewandten Suchschritte erhaltenen Verbindungen war dabei Gegenstand dieser Arbeit.

Die Carboanhydrasen (CAII) gehören zu der Klasse der Hydrolyasen. Das Enzym hat ein Molekulargewicht von 28–30kDa und katalysiert die reversible Reaktion der Hydratation von CO₂. Das aktive Zentrum der humanen CAII ist, wenn kein Ligand gebunden ist, von einem Netzwerk Wasserstoffbrücken-gebundener Wassermoleküle durchzogen. Am Boden einer 15Å tiefen, kegelförmigen, amphiphilen Bindetasche befindet sich Zink als Zentralatom verankert.

Die humane Carboanhydrase II (HCAII) ist in vielen Organen des menschlichen Körpers lokalisiert. Eine Schlüsselrolle spielt die humane CAII bei der Regulierung des Augeninnendruckes in den Ziliarkörperfortsätzen der Augen durch die Produktion von Kammerwasser. Ein pathologisch erhöhter intraokularer Druck (IOD) von über 21mmHg ist ein Symptom für die Augenkrankheit *Glaukom* bzw. „*Grüner Star*“. Das Glaukom stellt eine Erkrankung dar, welche zu einer progressiven Schädigung des Sehnervs und dem Verlust der visuellen Funktion führt. Es wird angenommen, daß sieben Millionen Menschen weltweit an *Glaukom* erkrankt sind und behandelt werden müssten. Als Therapeutika werden hauptsächlich Carboanhydrase-Inhibitoren aus der Substanz-Klasse der Sulfonamide eingesetzt, die die humane CAII inhibieren, was zur einer 25-30% Abnahme des IOD beim Menschen führt.

Ein „Klassiker“ unter den CAII-Inhibitor ist das bereits vor rund 40 Jahren entwickelte Acetazolamid (Diamox[®]) Dieser Wirkstoff führt, oral und intravenös

verabreicht, jedoch zu starken systemischen Nebenwirkungen. Der Grund hierfür ist die ubiquitäre Verteilung der Carboanhydrase im menschlichen Körper. Mittlerweile gibt es zwei weitere Wirkstoffe am Markt, Dorzolamid (Trusopt[®]) und Brinzolamid (Azopt[®]), die topisch am Auge appliziert werden. Aufgrund ihrer Wasser- und Fettlöslichkeit sind sie als Ampholyt in der Lage, in das menschliche Auge zu diffundieren und dort gezielt die humane CAII zu inhibieren. Auch diese Inhibitoren sind nicht frei von Nebenwirkungen, so daß intensiv die Weiterentwicklung dieser Substanzen vorangetrieben wird. Bei der Suche bzw. Entwicklung von neuen CAII-Inhibitoren mit dem Ziel als topisch verabreichtes Medikament für das Glaukom eingesetzt zu werden, sind somit hohe Anforderungen an die Verbindung gestellt. Gefordert sind ein Gleichgewicht zwischen Wasser- und Fettlöslichkeit bei gleichzeitig hoher Affinität zur humanen CAII.

Sulfonamidische CAII-Inhibitoren inhibieren die humane CAII in der anionischen Form über einen kompetitiven Mechanismus. Die wahrscheinlich deprotonierte Sulfonamidgruppe $R-SO_2-NH^-$ bindet über den Stickstoff an das zweifach positiv geladene Zink und verdrängt dabei das im nativen Enzym gebundene Hydroxyl-Ion. Es entsteht ein verzerrter Tetraeder, wobei die Stickstoffe der drei Histidinliganden und der Stickstoff aus der Sulfonamidgruppe auf den Ecken dieses Tetraeders sitzen. Der Wasserstoff der Sulfonamidgruppe wechselwirkt mit Thr-199, während ein Sauerstoff der Sulfonamidgruppe eine Wasserstoffbrückenbindung mit der NH-Gruppe des Thr-199 eingeht. Aromatische bzw. heterozyklische Ringsysteme der Inhibitoren gehen mit der humanen CAII unter Einbeziehung der Seitenketten von Val-121, Phe-131, Val-143, Leu-198 und Trp-209 hydrophobe Wechselwirkungen ein.

Neben der etablierten „Sulfonamidischen Ankergruppe“ am Zink der CAII wurde vor kurzem die bereits bei anderen zinkhaltigen Enzymen erfolgreich als Zinkanker eingesetzte Hydroxamat-Gruppe im Komplex mit der CAII strukturell charakterisiert.

Ein neuer Bindungsmodus wird hierbei für die Hydroxamatgruppe als Liganden in der Kristallstruktur der humanen CAII beobachtet.

Ein Ziel der Arbeit war das sukzessive Durchsuchen von Datenbanken. Um eine Kontrolle über den Erfolg und die Aussagekraft der angewandten Suchkriterien zu behalten, wurde ein Testdatensatz aus 35 literaturbekannten CAII-Inhibitoren zusammengestellt, um bei jedem Filterschritt zu überprüfen, ob die Strukturen des Testdatensatzes als Treffer wiedergefunden werden und gleichzeitig eine Bewertung im vorderen Bereich der ausgewählten Verbindungen erfahren. Eine gezielte Optimierung der Filterkriterien, speziell bezogen auf diesen Testdatensatz, wurde nur bedingt vorgenommen, da in allen Filterschritten vermieden werden sollte, daß neue, von dem Testdatensatz abweichende Strukturen direkt ausgemustert werden.

Die eingesetzten Molekül-Datenbanken MAYBRIDGE (Maybridge Chemical Company Ltd., England) und LEADQUEST (Tripos, Inc. St.Louis, USA) umfassen zusammen 98.997 Einträge, die anhand ihrer Kennung identifiziert und in Substanz erworben werden können.

Um Verbindungen auszuschließen, die als Salze in diesen Datenbanken vorliegen, aber auch um die „Lipinski-Regeln“ zu berücksichtigen, wurde als erster grober Filter eine Vorauswahl der Datenbank-Verbindungen vorgenommen. Durch eine Filterfunktion (Angabe bestimmter Grenzwerte, z.B. für Molekülmasse, Chiralität, Anzahl der Ringe, Metallatome) konnten Verbindungen selektiert werden, die diesem Kriterium genügen.

Der erste Filterschritt nach dieser Vorauswahl folgt zunächst dem Konzept, allein Informationen zu verwenden, die sich aus den Eigenschaften bekannter Inhibitoren ablesen lassen (z.B. deren Konnektivität, Art der Zink-bindenden Gruppe usw.). Dieser Filterschritt benötigt zunächst noch keine Informationen über z.B. die Verteilung von Wassermolekülen in der Bindetasche oder die Protonierung des Liganden. Alle weiteren, darauf aufbauenden Suchen sind strukturbasiert, setzen also die Kenntnis und Analyse der Bindetasche voraus. Ausgehend von den insgesamt 98.997 Verbindungen aus den Datenbanken wurde so auf eine Gesamtzahl von 98.850 Strukturen reduziert. Die Differenz von nur 147 zeigt, daß die verwendeten Datenbanken bereits nach diesen Kriterien voroptimiert wurden.

Bei der ersten zielgerichteten Suche nach neuen Leitstrukturen, durchgeführt mit dem Programm UNITY, wurde nach solchen Verbindungen selektiert, die eine der folgenden terminalen funktionellen Gruppen (Ankergruppen) tragen. Zu den gesuchten Ankergruppen zählten: Hydroxamate, Thiadiazol-thiocarbonyle, Sulfondiimide, Sulfonamide, Phosphate, Phosphoramide, Amide und Carbonsäuren. Zur Datenauswahl wurde ein 2D-Topologiesuchverfahren eingesetzt. Es bietet die Möglichkeit, eine große Zahl an Strukturen schnell zu durchmustern. Mit geringem Rechenaufwand (30 Minuten) wurden so die Datenbanken von den ursprünglichen 98.850 Strukturen auf 5.904 reduziert. Dieser verbleibenden Datensatz diente als Ausgangspunkt für weitere, nach schärferen und anspruchsvolleren Kriterien festgelegten Suchen. Der Testdatensatz passierte diesen Filterschritt vollständig. Eine Alternative zu der Topologiesuche besteht in einer fragmentbasierten 3D-Ähnlichkeitssuche mit dem Programm RIGFIT. Der Vorteil von RIGFIT ist, daß kein genaues Konnektivitätsmuster für eine Zink-bindende Gruppe vorgegeben werden muß. Die Abstraktion auf mit physiko-chemischen Eigenschaften beladene *Gauss*-Funktionen erlaubt das Auffinden von neuen Fragmenten. Allein die Referenz (hier Sulfonamidgruppe) wurde als bekannte Gruppe vorgegeben. Die RIGFIT-Suche impliziert allerdings als Schwierigkeit,

daß ein Grenzwert für die noch als relevant angesehene Ähnlichkeit mit der Referenz definiert werden muß. Die unbefriedigende Anreicherung der Testdatensatzverbindungen machte jedoch klar, wie schwierig die Definition eines solchen „Grenzwertes“ ist. Eine Hinzunahme anderer Zink-bindender Gruppen als Referenz ergab einen verbesserten Überblick. Dennoch muß an dieser Stelle in Kauf genommen werden, daß ein Teil der Testdatensatzverbindungen nicht selektiert wird. Nicht unbedingt kann jede durch den RIGFIT-Ansatz als ähnlich erkannte Gruppe auch als brauchbares Ankerfragment für einen vorstellbaren humanen CAII-Inhibitor angesehen werden. Mit dem Ansatz besteht allerdings die Chance, auf neue unerwartete Alternativen aufmerksam zu werden. Überraschenderweise konnte so beispielsweise eine Verbindungen gefunden werden, deren Fragment eine strukturelle Verwandtschaft mit einer Verbindung besitzt, die bereits für ein anderes Zink-tragendes Enzym (Cytosin-Desaminase) erfolgreich untersucht wurde.

Im Hinblick auf die Wiederfindungsrate der vorgegebenen bekannten Sulfonamide besteht allerdings die Gefahr, daß beim Festsetzen eines strengen Grenzwertes der Ähnlichkeit zu viele Verbindungen mit einem brauchbaren Anker verloren gehen. Darin ist auch der Grund zusehen, warum bei den anschließenden Filterschritten die aus der 2D-Topologiesuche selektierten Verbindungen verwendet wurden.

Die nun folgenden Filterschritte setzen eine genaue Kenntnis der Raumstruktur der Bindetasche der humanen CAII voraus. Dementsprechend wurden 24 Komplexstrukturen mit dem Programm RELIBASE+ überlagert, um die Bewegungen von Seitenketten in der Bindetasche zu erkennen, aber auch um eine Identifizierung von Wassermolekülen durchzuführen, die in der Mehrzahl der analysierten Komplexstrukturen immer wieder an denselben Positionen vorkommen. Einzig konnte eine signifikante Konformationsänderung von His-64 beobachtet werden, eine Aminosäure, die am äußeren Rande der Bindetasche sitzt. Unter gleichzeitiger Berücksichtigung strukturtypischer Deskriptoren wie B-Faktoren, lokaler Hydrophobizitäten und benachbarter Wasserstoffbrückenpartner konnten vier Wassermoleküle identifiziert werden. Um den Verdacht auf eine wenig begünstigte Verdrängbarkeit dieser Wassermoleküle zu untermauern, wurden Berechnungen der Lage und wechselseitigen Verbrückungen dieser Wassermoleküle mit MAB/MOLOC durchgeführt. Während des flexiblen Einpassens (Docking) von Verbindungen in die Bindetasche der humanen CAII wurden diese Wassermoleküle zur sterischen Beschränkung der Bindetasche berücksichtigt. Zur Überprüfung der Relevanz der so platzierten Wassermoleküle im Hinblick auf ein Ligandendocking mit FLEXX wurden die Docking Ergebnisse mit Dorzolamid als Testverbindung mit der Kristallstruktur dieses Komplexes verglichen. Durch die Einschränkung des Konformationsraumes, der

den Verbindungen bei Berücksichtigung der Wassermoleküle in der Bindetasche zur Verfügung steht, konnte somit eine deutliche Verbesserung erzielt werden.

Eine Analyse der Bindetasche wurde anhand verschiedener Sonden mit den Programmen GRID, SUPERSTAR, LUDI und DRUGSCORE durchgeführt. Ziel war dabei, eine Identifizierung von Wechselwirkungsbereichen vorzunehmen, um letztendlich ein Pharmakophormodell zu erstellen. Diese Sonden tasten die Bindetasche auf mögliche Wechselwirkungen mit denkbaren funktionellen Gruppen eines Liganden ab. Als Sonden wurden eine C=O-Gruppe (H-Brückenakzeptor), eine amidische N-H-Gruppe (H-Brückendonor) und eine CH₃-Gruppe (hydrophobe Sonden) verwendet. Alle vier Methoden sind in der Lage, für H-Brückenakzeptoren und H-Brückendonoren gut interpretierbare Feldbeiträge innerhalb der Bindetasche der humanen CAII zu generieren bzw. Zentren zu platzieren. Zur gezielten Platzierung hydrophober Gruppen eines potentiellen Inhibitors wurden zusätzlich die Bindungsmodi aus den Kristallstrukturen einiger Inhibitor-Komplexe berücksichtigt.

Ein Pharmakophormodell wurde durch die Platzierung von fünf mit entsprechenden Eigenschaften belegten Sphären in UNITY aufgebaut. Die aus Pseudoatomen (z.B. H-Brücken-Donor, -Akzeptor, hydrophobes Zentrum) bestehenden Sphären bzw. Kugeln wurden basierend auf den von SUPERSTAR generierten komplementären Feldbeiträgen im Raum platziert. Eine Verbindung aus den Datenbanken wird als Treffer gewertet, wenn Atome der gesuchten Eigenschaften bei einer flexiblen 3D-UNITY-Suche innerhalb (einschließlich der äußeren Begrenzung) der vorgegebenen Sphären platziert werden. Nach einer Rechenzeit von 5 Stunden verblieben 3314 Verbindungen. Die Vertreter des Testdatensatzes passierten wiederum vollständig diesen Filterschritt.

Um eine Reihung („Ranking“) dieser Verbindung anhand einer Scoringfunktion bzw. eines Ähnlichkeitsmaßes zu bestimmen und damit ein Entscheidungskriterium für den Vorschlag neuer potentieller Inhibitoren zu erhalten, standen zwei Alternativen als anschließende Filter zur Verfügung. Zum einen die flexible Überlagerung auf einen im Bindungsmodus strukturell bestimmten Inhibitor oder das flexible Einpassen der Verbindungen in eine als rigide vorgegebene Bindetasche. Eine Kombination beider Verfahren hat den Vorteil, daß auch Wissen über die chemische Struktur bekannter Inhibitoren in die Auswahl mit einfließt. Ein reiner Docking-Ansatz ignoriert dieses Wissen. Beispielsweise verweist die gesamte bisher bekannte Erfahrung über humane CAII-Inhibitoren darauf, daß für dieses Enzym die Sulfonamidgruppe einen geeigneten Anker zur Zinkkoordination darstellt. Dieses Wissen wird implizit über eine Reihung mit FLEXS eingebracht. Für die Überlagerung wurden Dorzolamid und Acetazolamid als Referenzen gewählt, beides potente und bekannte Inhibitoren, für die Bindungsgeometrien kristallographisch mit hoher Auflösung charakterisiert wurden.

Bei der flexiblen Überlagerung mit FLEXS besteht mittlerweile die Möglichkeit, unter Verwendung der *Gauss*-Funktionen einen „gemittelten“ Inhibitor zu bilden. Hierbei werden physiko-chemische Eigenschaften beschreibende *Gauss*-Funktionen von z.B. Dorzolamid mit denen eines strukturell größeren Inhibitor vereint. Durch Bilden der Vereinigungsmenge wird erreicht, daß vor allem bei strukturell größeren Datenbankverbindungen als die Referenzen, ein Einfluß auf den konformativen Aufbau eines zu überlagernden Liganden genommen werden kann. Weiterhin wurden von den die Bindetasche beschreibenden Aminosäuren Atompositionen übernommen, die die Bindetasche in Form von sterisch repulsiven *Gauss*-Funktionen räumlich begrenzen. Durch die Hinzunahme des Testdatensatzes wurde ein Anreicherungsfaktor errechnet, der als quantitatives Maß anzeigt, wie gut das gegebene Suchkriterium potentielle Inhibitoren herausfiltert und diese auf die vorderen Ränge bei der Reihung durch den verwendeten Ähnlichkeitsindex plaziert.

Mit Dorzolamid als Referenz konnten nach 10% der durchsuchten Datenbankverbindungen nur 45% der Testdatensatzverbindungen angereichert werden, ein möglicher Grund für dieses Ergebnis ist in der Verdrängung der aktiven Verbindungen des Testdatensatzes durch potentiell affinere Verbindungen zu sehen.

Im folgenden Schritt wurden die mit FLEXS bewerteten Verbindungen mit FLEXX in die Bindetasche eingepaßt. Es wurden insgesamt 100 der am „besten“ platzierten Verbindungen von FLEXS ausgewählt, einerseits um ihre Paßform auf die Bindetasche zu überprüfen, andererseits um durch die Scoringfunktion in dem Dockingverfahren eine weitere Reihung und insbesondere eine quantitative Affinitätsvorhersage zu bekommen.

Die Bindung der sulfonamidischen Gruppe an das in der Bindetasche vorhandene Zink wurde zunächst durch die gezielte Modifizierung (Atomtypenänderung, Formalladung setzen, Deprotonierung) erzwungen, wobei FLEXX auch Geometrien mit einer zweizähligen Koordination an das Zink ausbildet. Eine Weiterentwicklung des *MapRef*-Modus in FLEXX ermöglicht mittlerweile die Verwendung eines sogenannten Referenzfragmentes. Hierbei wird die funktionelle Gruppe des Inhibitors (sulfonamidischer Anker) in seiner von dem Bindungsmodus bekannter Inhibitoren abgeleiteten räumlichen Orientierung als Referenzfragment vorgegeben. Alle potentiellen Inhibitoren, die ebenfalls dieses Fragment besitzen, wurden so, beginnend mit der Überlagerung dieses Fragmentes mit dem sulfonamidischen Referenzfragment in die Bindetasche eingepaßt. Die bereits oben beschriebenen vier Wassermoleküle wurden dabei als sterische Blockierung beim Einpassen der potentiellen Inhibitoren in der Bindetasche berücksichtigt. Im Anschluß wurden die mit FLEXX in die Bindetasche eingepaßten und bewerteten Bindungsmodi der einzelnen

Verbindungen einer weiteren Bewertung durch DRUGSCORE unterzogen. Hierbei greift DRUGSCORE auf die von FLEXX erzeugten Plazierungen der einzelnen Verbindungen zu und führt eine neue (nachgeschaltete) Reihung und Bewertung durch.

Die Auswahl der Vorschläge beruht auf den durch FLEXS, FLEXX und DRUGSCORE vorgenommenen Bewertungen und einer abschließenden visuellen Auswertung der einzelnen Bindungsmodi, die u.a. auf Analysen der amphiphilen Bindetasche basiert. Ferner wurden bei der Auswahl der einzelnen Vorschläge die Deskriptoren (z.B. MlogP, Anzahl drehbarer Bindungen usw.) in Betracht gezogen. Kriterien, die bei der Auswahl der Verbindungen eine entscheidende Rolle spielten, werden im folgenden kurz vorgestellt. Zur optimalen Ausfüllung der amphiphilen Tasche bieten sich neben den beschriebenen Ankergruppen im weiteren Verlauf des Ligandenaufbaus in der Tasche z.B. 5-, 6-, bi- oder trizyklische Ringsysteme an, wobei auch heterozyklische Systeme bei der Auswahl berücksichtigt wurden. Die Bindung von starren Ringstrukturen ist in der Regel mit einem kleineren Verlust an inneren Freiheitsgraden verbunden im Vergleich zu flexiblen, kettenförmigen Liganden. Aus entropischen Gründen sollte dies zu einer Verbesserung der Affinität führen. Weiterhin wurden Ring-Substituenten mit H-Akzeptor-Gruppen (z.B. C=O-Gruppen) gesucht, die Wasserstoffbrücken zu Gln-92 oder zu Thr-200 ausbilden können. Diese Wechselwirkungen müssen die zur Ligandbindung erforderliche Desolvatation der Aminosäuren kompensieren.

Ein großer Teil der insgesamt durch FLEXS hochbewerteten Verbindungen waren Säureamide und Carbonsäuren. Diese Verbindungen wurden, da ein Schwerpunkt auf die Verbindungen gelegt wurde, die einen sulfonamidschen Anker (bzw. Hydroxamat) besaßen, nur bedingt als mögliche Vorschläge in Betracht gezogen. Begründen ließ sich dies, zum einen durch die guten Bindungseigenschaften der Sulfonamide und zum anderen in der kapazitiven Beschränkung im Hinblick auf die Beschaffung und *in vitro*-Testung der Verbindungen. Unter Berücksichtigung aller Ausschlußkriterien ließen sich die 100 „best bewerteten“ Verbindungen, um 41 Verbindungen reduzieren, von den verbleibenden Verbindungen wurden nach einer abschließenden grafischen Auswertung 18 Verbindungen ausgewählt von den 13 Verbindungen schließlich getestet werden konnten, die eingeschränkte Verfügbarkeit einzelner Verbindungen seitens der Hersteller führte zu einer weiteren Reduzierung. Die Ergebnisse des *in vitro*-Enzymassay zeigten schließlich, daß drei subnanomolare Verbindungen, eine nanomolare Verbindung, fünf submikromolare Verbindungen und zwei mikromolare Verbindungen selektiert werden konnten.

Die im Enzymassay charakterisierten Vorschläge wurden anschließend zum „Soaking“ in die Kristalle der humanen CAII eingesetzt, um Hinweise über ihre

tatsächlichen Bindungsmodi zu erhalten und um die durch die Programme FLEXX und DRUGSCORE vorhergesagten Bindungsmodi zu überprüfen. Trotz der eingeschränkten Löslichkeit der Inhibitoren und einer nur geringen Zahl zur Verfügung stehender Proteinkristalle war das Soakingexperiment bei zwei Verbindungen erfolgreich.

Ein Vergleich der durch FLEXX und DRUGSCORE vorgeschlagenen „besten“ Bindungsmodi mit den Kristallstrukturen der zwei Inhibitoren ergab, daß DRUGSCORE aus der Menge der mit FLEXX erzeugten Bindungsmodi eine Geometrie hervorhebt, die der Kristallstruktur deutlich näherkommt als die durch die Scoringfunktion in FLEXX hervorgehobenen Plazierungen.

Patentrecherchen haben gezeigt, daß sich unter den entdeckten nanomolaren und subnanomolaren Verbindungen ein neues nicht durch aktuelle Patente belegtes Gerüst befindet. Ein solches Gerüst wird allgemein als „neue Leitstruktur“ akzeptiert. Bei der Weiterentwicklung der gefunden Leitstrukturen zu einem Wirkstoff wäre somit als nächster Schritt die Testung der hochaffinen Verbindungen in der Zelle und schließlich am Tiermodell (Kaninchenauge) zu sehen.

Abschließend läßt sich zusammenfassen, daß durch die in dieser Arbeit eingesetzten Verfahren zum *virtuellen Screening* von Moleküldatenbanken und dem strukturbasierten Wirkstoffdesign man in der Lage ist, unter bestimmten Voraussetzungen einen Beitrag zur experimentellen Hochdurchsatztestung (HTS) zu leisten, um damit neue Leitstrukturen zu entdecken.

5 Literaturverzeichnis

- Alexander, R. S., Nair, S. K. & Christianson, D. W. (1991). Engineering the Hydrophobic Pocket Of Carbonic Anhydrase II. *Biochemistry* **30**(46), 11064-11072.
- Allen, F. H., Davies, J. E., Galloy, J. J., Johnson, O., Kennard, O., Macrae, C. F., Mitchell, E. M., Mitchell, G. F., Smith, J. M. & Watson, D. G. (1991). The development of version-3 and version-4 of the Cambridge Structural Database system. *J Chem Inf Comput Sci* **31**, 187-204.
- Ash, S., Cline, M. A., Homer, R. W., Hurst, T. & Smith, G. B. (1997). SYBYL Line Notation (SLN): A Versatile Language for Chemical Structure Representation. *J Chem Inf Comput Sci* **37**, 71-79.
- Babine, R. E. & Bender, L. B. (1997). Molecular Recognition of Protein-Ligand Complexes : Application to Drug Design. *Chem Rev* **97**, 1359-1472.
- Baldwin, J. J., Ponticello, G. S., Anderson, P. S., Christy, M. E., Murcko, M. A., Randall, W. C., Schwam, H., Sugrue, M. F., Springer, J. P., Gautheron, P., Grove, J., Mallorga, P., Viader, M. P., McKeever, B. M. & Navia, M. A. (1989). Thienothiopyran-2-sulfonamides: novel topically active carbonic anhydrase inhibitors for the treatment of glaucoma. *Journal of Medicinal Chemistry* **32**(12), 2510-3.
- Bamborough, P. & Cohen, F. E. (1996). Modeling protein-ligand complexes. *Current Opinion in Structural Biology* **6**, 236-241.
- Baxter, C. A., Murray, C. W., Clark, D. E., Westhead, D. R. & Eldridge, M. D. (1998). Flexible Docking Using Tabu Search and an Empirical Estimate of Binding Affinity. *Proteins* **33**(367-382).
- Baxter, C. A., Murray, C. W., Waskowycz, B., Li, J., Sykes, R. A., Bone, R. G. A., Perkins, T. D. J. & Wylie, W. (2000). New Approach to Molecular Docking and Its Application to Virtual Screening of Chemical Databases. *J Chem Inf Comput Sci* **40**, 254-262.
- Behravan, G., Jonsson, B. H. & Lindskog, S. (1990). Fine tuning of the catalytic properties of carbonic anhydrase. Studies of a Thr200----His variant of human isoenzyme II. *Eur J Biochem* **190**(2), 351-7.
- Bernstein, F. C., Koetzle, T. F., Williams, G. J. B., Meyer Jr, E. F., Brice, M. D., Rodgers, J. R., Kennard, O., Shimanouchi, T. & Tasumi, M. (1977). The Protein

- Data Bank: a computer-based archival file for macromolecular structures. *J Mol Biol* **112**, 535-542.
- Böhm, H. J. (1992a). The computer program LUDI: a new method for the de novo design of enzyme inhibitors. *J Comput Aided Mol Des* **6**(1), 61-78.
- Böhm, H. J. (1992b). LUDI: rule-based automatic design of new substituents for enzyme inhibitor leads. *J Comput Aided Mol Des* **6**(6), 593-606.
- Böhm, H. J. (1994). The development of a simple empirical scoring function to estimate the binding constant for a protein-ligand complex of known three-dimensional structure. *J Comput Aided Mol Des* **8**(3), 243-56.
- Böhm, H. J. (1998). Prediction of binding constants of protein ligands: a fast method for the prioritization of hits obtained from de novo design or 3D database search programs. *J Comput Aided Mol Des* **12**(4), 309-23.
- Böhm, H. J. & Klebe, G. (1996). Was läßt sich aus der molekularen Erkennung in Protein-Ligand-Komplexen für das Design neuer Wirkstoffe lernen? *Angewandte Chemie* **108**(22), 2750-2778.
- Boobbyer, D. N., Goodford, P. J., McWhinnie, P. M. & Wade, R. C. (1989). New hydrogen-bond potentials for use in determining energetically favorable binding sites on molecules of known structure. *J Med Chem* **32**(5), 1083-94.
- Boriack, P. A., Christianson, D. W., Kingery-Wood, J. & Whitesides, G. M. (1995). Secondary interactions significantly removed from the sulfonamide binding pocket of carbonic anhydrase II influence inhibitor binding constants. *Journal of Medicinal Chemistry* **38**(13), 2286-2291.
- Boriack-Sjodin, P. A., Zeitlin, S., Chen, H. H., Crenshaw, L., Gross, S., Dantanarayana, A., Delgado, P., May, J. A., Dean, T. & Christianson, D. W. (1998). Structural analysis of inhibitor binding to human carbonic anhydrase II [In Process Citation]. *Protein Sci* **7**(12), 2483-9.
- Brandt, C., Grunze, H., Normann, C. & Walden, J. (1998). Acetazolamide in the treatment of acute mania [In Process Citation]. *Neuropsychobiology* **38**(3), 202-3.
- Brechue, W. F. & Maren, T. H. (1993). Carbonic anhydrase inhibitory activity and ocular pharmacology of organic sulfamates. *J Pharmacol Exp Ther* **264**(2), 670-5.
- Briem, H. & Kuntz, I. D. (1996). Molecular similarity based on DOCK-generated fingerprints. *J Med Chem* **39**(17), 3401-8.
- Brint, A. T. & Willett, P. (1989). Upperbound procedures for the identification of similar three- dimensional chemical structures. *J Comput Aided Mol Des* **2**(4), 311-20.

- Bruno, I. J., Cole, J. C., Lommerse, J. P. M., Rowland, R. S., Taylor, R. & Verdonk, M. L. (1997). IsoStar: a library of information about nonbonded interactions. *J Comput Aided Mol Des* **11**, 525-537.
- Burley, S. K., Almo, S. C., Bonanno, J. B., Capel, M., Chance, M. R., Gaasterland, T., Lin, D., Sali, A., Studier, F. W. & Swaminathan, S. (1999). Structural genomics: beyond the human genome project. *Nat Genet* **23**(2), 151-157.
- Cantor, C. R. & Schimmel, P. R. (1980). Part 11: Techniques for the Study of Biological Structure and Function. In *Biophysical Chemistry* (Freeman, W. H., ed.), San Francisco, USA.
- Cappalonga, A. M., Alexander, R. S. & Christianson, D. W. (1994). Mapping Protein-Protein Affinity: Binding of Petidylsulfonamid Inhibitors of Human Carbonic Anhydrase II. *J Am Chem Soc* **116**, 5063-5068.
- Carbó, R., Leyda, L. & Arnau, M. (1980). How Similar is a Molecule to Another? An Electron Density Measure of Similarity between Two Molecular Structures. *Int. J. Quantum. Chem.* **17**, 1185-1189.
- Charifson, P. S., Corkerey, J. J., Murcko, M. A. & Walters, W. P. (1999). Consensus Scoring: A Method for Obtaining Improved Hit Rates from Docking Databases of Three-Dimensional Structures into Proteins. *J Med Chem* **42**, 5100-5109.
- Chen, R. F. & Kernohan, J. C. (1967). Combination of Bovine Carbonic Anhydrase with Fluorescent Sulfonamide. *J Biol Chem* **242**(24), 5813-5823.
- Chin, D. N., Lau, A. Y. & Whitesides, G. M. (1998). Studying How Different Terminal Groups Change the Motion Of H₂nso₂c₆h₄conh(Eg)(3)R When Bound to the Active Site Of Human Carbonic Anhydrase Ii. *Journal of Organic Chemistry* **63**(4), 938-945.
- Christianson, D. W. & Fierke, C. A. (1996). Carbonic anhydrase: evolution of the zinc binding site by nature and design. *Accounts of Chemical Research* **29**, 331-339.
- Clark, D. E. & Pickett, S. D. (2000). Computational methods for the prediction of 'drug-likeness'. *Drug Discovery Today* **5**(2), 49-57.
- Clark, M., Cramer III, R. D., Jones, D. M., Patterson, D. E. & Smeroth, P. E. (1990). Comparative Molecular Field Analysis (CoMFA). 2. Toward its Use with 3D-Structural Databases. *Tetrahedron Comp. Methodol.* **3**, 47-59.
- Connolly, M. L. (1983). Solvent-Accessible Surface of Proteins and Nucleic Acids. *Science* **221**, 709-713.
- Copeland, R. A. (1996). *Enzymes-A practical Introduction to Structure, Mechanism and Data Analysis*, VCH Publishers, Inc., New York, USA.
- Cornish-Bowden, A. (1995). *Fundamentals of Enzyme Kinetics*, Princeton University Press, Princeton, USA.

- Dean, P. M., Ed. (1995). *Molecular Similarity in Drug Design*. Edited by Dean, P. M. London: Blackie Academic & Professional.
- Diestelhorst, M. (1997). Glaucoma Therapy with Prostaglandine-F2alpha-Derivates. *Ophthalmologie* **94**, 754-769.
- Dill, K. A. (1997). Additivity principles in biochemistry. *J Biol Chem* **272**(2), 701-704.
- Downs, G. M. & Willett, P. (1996). Similarity Searching in Databases of Chemical Structures. In *Reviews in Computational Chemistry* (Lipkowitz, K. B. & Boyd, D. B., eds.), Vol. 7, pp. 1-66. VCH Publishers, Inc., New York.
- Elbaum, D., Nair, S. K., Patchan, M. W., Thompson, R. B. & Christianson, D. W. (1996). Structure-Based Design Of a Sulfonamide Probe For Fluorescence Anisotropy Detection Of Zinc With a Carbonic Anhydrase-Based Biosensor. *Journal of the American Chemical Society* **118**(35), 8381-8387.
- Eldridge, M. D., Murray, C. W., Auton, T. R., Paolini, G. V. & Mee, R. P. (1997). Empirical scoring functions: I. The development of a fast empirical scoring function to estimate the binding affinity of ligands in receptor complexes. *J Comput Aided Mol Des* **11**(5), 425-45.
- Engh, R. A. & Huber, R. (1991). Accurate bond and angle parameters for X-ray protein structure refinement. *Acta Crystallogr* **47**, 392-400.
- Engstrand, C., Forsman, C., Liang, Z. & Lindskog, S. (1992). Proton transfer roles of lysine 64 and glutamic acid 64 replacing histidine 64 in the active site of human carbonic anhydrase II. *Biochem Biophys Acta* **1122**, 321-326.
- Eriksson, A. E., Jones, T. A. & Liljas, A. (1988). Refined Structure Of Human Carbonic Anhydrase Ii At 2.0 Å Resolution. *Proteins* **4**(4), 274-282.
- Ferguson, A. M., Patterson, D. E., Garr, C. D. & Underiner, T. L. (1996). Designing Chemical Libraries for Lead Discovery. *Journal of Biomolecular Screening* **1**(2), 65-73.
- Fradera, X., Knegetel, R. M. A. & Mestres, J. (2000). Similarity-Driven Flexible Ligand Docking. *Proteins*(40), 623-636.
- Frey, M. (1993). Water Structure of Crystallized Proteins: High-Resolution Studies. In *Water and Biological Macromolecules* (Westhof, E., ed.), Vol. 4, pp. 99-147. 4 vols. CRC Press Inc., Boca Raton.
- Gao, J. (1995). Methods and Applications of Combined Quantum Mechanical and Molecular Mechanical Potentials. In *Reviews in Computational Chemistry* (Lipkowitz, K. B. & Boyd, D. B., eds.), Vol. 6. VCH Publishers, Inc., New York.

- Gao, J., Qiao, S. & Whitesides, G. M. (1995). Increasing binding constants of ligands to carbonic anhydrase by using "greasy tails". *Journal of Medicinal Chemistry* **38**(13), 2292-301.
- Gasteiger, J. & Marsili, M. (1980). Iterative Partial Equalization of Orbital Electronegativity - A Rapid Access to Atomic Charges. *Tetrahedron* **36**, 3219-3228.
- Gerber, P. R. & Müller, K. (1995). MAB, a generally applicable molecular force field for structure modelling in medicinal chemistry. *J Comput Aided Mol Des* **9**, 251-268.
- Gigant, B., Charbonnier, J.-B., Eshar, Z., Green, B. S. & Knossow, M. (1997). X-ray structure of hydrolytic antibody and of complexes elucidate catalytic pathway from substrate binding and transition state stabilization through water attack and product release. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 7857-7861.
- Gohlke, H., Hendlich, M. & Klebe, G. (2000). Knowledge-based Scoring Function to Predict Protein-Ligand Interactions. *J Mol Biol* **295**, 337-356.
- Goldberg, D. E. (1989). *Genetic Algorithms in Search, Optimization and Machine Learning*, Addison-Wesley, Wokingham.
- Goodford, P. J. (1985). A computational procedure for determining energetically favorable binding sites on biologically important macromolecules. *J Med Chem* **28**(7), 849-57.
- Graham, S. L., Hoffman, J. M., Gautheron, P., Michelson, S. R., Scholz, T. H., Schwam, H., Shepard, K. L., Smith, A. M., Smith, R. L., Sondey, J. M. & *et al.* (1990). Topically active carbonic anhydrase inhibitors. 3. Benzofuran- and indole-2-sulfonamides. *Journal of Medicinal Chemistry* **33**(2), 749-54.
- Graham, S. L., Shepard, K. L., Anderson, P. S., Baldwin, J. J., Best, D. B., Christy, M. E., Freedman, M. B., Gautheron, P., Habecker, C. N., Hoffman, J. M. & *et al.* (1989). Topically active carbonic anhydrase inhibitors. 2. Benzo[b]thiophenesulfonamide derivatives with ocular hypotensive activity. *Journal of Medicinal Chemistry* **32**(12), 2548-54.
- Grams, F., Crimmin, M., Hinnes, L., Huxley, P., Pieper, M., Tschesche, H. & Bode, W. (1995). Structure determination and analysis of human neutrophil collagenase complexed with a hydroxamate inhibitor. *Biochemistry* **34**(43), 14012-14020.
- Greco, G., Novellino, E. & Martin, Y. C., Eds. (1998). 3D-QSAR Methods. Designing Bioactive Molecules. Edited by Martin, Y. C., Willett, P. & Heller, S. R. Washington, DC: American Chemical Society.

- Greer, J., Erickson, J. W. & Varney, M. (1994). Application of the Three-Dimensional Structures of Protein Target Molecules in Structure-Based Design. *J Med Chem* **37**, 1035-1054.
- Hakansson, K., Carlsson, M., Svensson, L. A. & Liljas, A. (1992). Structure Of Native and Apo Carbonic Anhydrase II and Structure Of Some Of Its Anion-Ligand Complexes. *Journal of Molecular Biology* **227**(4), 1192-1204.
- Hakansson, K. & Wehnert, A. (1992). Structure of cobalt carbonic anhydrase complexed with bicarbonate. *Journal of Molecular Biology* **228**(4), 1212-8.
- Hansch, C., Unger, S. H. & Forsythe, A. B. (1973). Strategy in Drug Design. Cluster Analysis as an Aid in the Selection of Substituents. *J Med Chem* **16**, 1212-1222.
- Hartmann, M. (1998). The Important Role of Active Site Water in the Catalytic Mechanism of Human Carbonic Anhydrase - A Semiempirical MO Approach to the Hydration of CO₂. *J Mol Model* **4**, 355-365.
- Hemm, K., Aberer, K. & Hendlich, M. (1995). Constituting a receptor-ligand information base from quality-enriched data. *Ismb* **3**, 170-8.
- Hendlich, M. (1998). Databases for protein-ligand complexes. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **54**(1 (Pt 6)), 1178-82.
- Hodgkin, E. E. & Richards, W. G. (1987). Molecular similarity based on electrostatic potential and electric-field. *International Journal of Quantum Chemistry* **14**, 105-110.
- Hopfinger, A. J. (1973). *Conformational Properties of Macromolecules*, Academic Press, New York.
- Houston, J. G. & Banks, M. (1997). The chemical-biological interface: developments in automated and miniaturised screening technology. *Curr Opin Biotechnol* **8**(6), 734-740.
- Huang, C. C., Lesburg, C. A., Kiefer, L. L., Fierke, C. A. & Christianson, D. W. (1996). Reversal of the hydrogen bond to zinc ligand histidine-119 dramatically diminishes catalysis and enhances metal equilibration kinetics in carbonic anhydrase II. *Biochemistry* **35**(11), 3439-46.
- Hunt, C. A., Mallorga, P. J., Michelson, S. R., Schwam, H., Sondey, J. M., Smith, R. L., Sugrue, M. F. & Shepard, K. L. (1994). 3-substituted thieno[2,3-b][1,4]thiazine-6-sulfonamides. A novel class of topically active carbonic anhydrase inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry* **37**(2), 240-7.
- Hurst, T. (1994). The directed tweak technique in 3D searching. *J Chem Inf Comput Sci* **34**(1), 190-196.

- Jackman, J. E., Merz, K. M. & Fierke, C. A. (1996). Disruption of the Active Site Solvent Network in Carbonic Anhydrase II Decreases the Efficiency of Proton Transfer. *Biochemistry* **35**(51), 16421-16428.
- Jain, A., Huang, C. & Whitesides, G. M. (1994a). Lack of Effect of the Length of Oligoglycine- and Oligo(ethylene glycol)-Derived para-Substituents on the Affinity of Benzenesulfonamides for Carbonic Anhydrase II in Solution. *J Am Chem Soc* **116**, 5057-5062.
- Jain, A., Whitesides, G. M., Alexander, R. S. & Christianson, D. W. (1994b). Identification of two hydrophobic patches in the active-site cavity of human carbonic anhydrase II by solution-phase and solid-state studies and their use in the development of tight-binding inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry* **37**(13), 2100-2105.
- Jones, G., Willett, P. & Glen, R. C. (1995a). A genetic algorithm for flexible molecular overlay and pharmacophore elucidation. *J Comput Aided Mol Des* **9**(6), 532-49.
- Jones, G., Willett, P. & Glen, R. C. (1995b). Molecular Recognition of Receptor Sites Using a Genetic Algorithm with a Description of Desolvation. *J Mol Biol* **245**, 43-55.
- Jones, G., Willett, P., Glen, R. C., Leach, A. R. & Taylor, R. (1997). Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking. *J Mol Biol* **267**(3), 727-48.
- Jones, T. A., Zou, J. Y., Cowan, S. W. & Kjeldgaard. (1991). Improved methods for binding protein models in electron density maps and the location of errors in these models. *Acta Crystallogr A* **47**(Pt 2), 110-119.
- Judson, R. (1997). Genetic Algorithms and Their Use in Chemistry. In *Reviews in Computational Chemistry* (Lipkowitz, K. B. & Boyd, D. B., eds.), Vol. 10, pp. 1-73. VCH Publishers, Inc., New York.
- Kearsley, S. K. & Smith, G. M. (1990). An Alternative Method for Alignment of Molecular Structures: Maximizing Electrostatic and Steric Overlap. *Tetrahedron Comp. Methodol.* **3**, 615-633.
- Kenny, A. D. (1985). Role of carbonic anhydrase in bone: partial inhibition of disuse atrophy of bone by parenteral acetazolamide. *Calcif Tissue Int* **37**(2), 126-33.
- Khalifah, R. G. (1971). The carbon dioxide hydration activity of carbonic anhydrase. I. Stop-flow kinetic studies on the native human isoenzymes B and C. *J Biol Chem* **246**, 2561-2573.
- Kiefer, L. L. & Fierke, C. A. (1994). Functional Characterization of Human Carbonic Anhydrase II Variants with Altered Zinc Binding Sites. *Biochemistry* **33**(51), 15233-15240.

- Kiefer, L. L., Krebs, J. F., Paterno, S. A. & Fierke, C. A. (1993). Engineering a Cysteine Ligand Into the Zinc Binding Site Of Human Carbonic Anhydrase Ii. *Biochemistry* **32**(38), 9896-9900.
- Klebe, G. & Mietzner, T. (1994). A fast and efficient method to generate biologically relevant conformations. *J Comput Aided Mol Des* **8**, 583-606.
- Klebe, G., Mietzner, T. & Weber, F. (1994). Different approaches toward an automatic structural alignmet of drug molecules: applications to sterol mimics, thrombin and thermolysin inhibitors. *J Comput Aided Mol Des* **8**, 751-778.
- Kleywegt, G. J. (1997). Validation of protein models from Calpha coordinates alone. *J Mol Biol* **273**(2), 371-376.
- Kollman, P. A. (1993). Free energy calculations: applications to chemical and biochemical phenomena. *Chem Rev* **93**, 2395-2417.
- Kramer, B., Rarey, M. & Lengauer, T. (1999). Evaluation of the FLEXX incremental construction algorithm for protein- ligand docking. *Proteins* **37**(2), 228-41.
- Krebs, J. F. & Fierke, C. A. (1993). Determinants of catalytic activity and stability of carbonic anhydrase II as revealed by random mutagenesis. *J Biol Chem* **268**(2), 948-54.
- Krebs, J. F., Fierke, C. A., Alexander, R. S. & Christianson, D. W. (1991). Conformational Mobility Of His-64 In the Thr-200-Ser Mutant Of Human Carbonic Anhydrase Ii. *Biochemistry* **30**(38), 9153-9160.
- Kubinyi, H., Ed. (1993). Theory Methods and Applications. Vol. 1. 3D QSAR in Drug Design. Edited by Kubinyi, H. 2 vols. Leiden: ESCOM.
- Kubinyi, H., Folkers, G. & Martin, Y. C., Eds. (1998). Ligand-Protein Interactions and Molecular Similarity. Vol. 2. 3D QSAR in Drug Design. Edited by Kubinyi, H., Folkers, G. & Martin, Y. C. Leiden: ESCOM.
- Kuntz, I. D., Blaney, J. M., Oatley, S. J., Langridge, R. & Ferrin, T. E. (1982). A Geometric Approach to Macromolecule-Ligand Interactions. *J Mol Biol* **161**, 269-288.
- Lahana, R. (1999). How many leads from HTS? *Drug Discovery Today* **4**(10), 447-448.
- Leatherbarrow, R. J. (2000). GraFit 4.0.12 edit. Erithacus Software Limited.
- Lemmen, C., Hiller, C., Kramer, B., Lengauer, T., Lilienthal, M., Rarey, M., Sonnenburg, F. & Zimmermann, M. (1999). FlexS 1.7 edit. GMD, Deutschland, Sankt Augustin, Deutschland.
- Lemmen, C., Hiller, C. & Lengauer, T. (1998a). RigFit: a new approach to superimposing ligand molecules. *J Comput Aided Mol Des* **12**(5), 491-502.
- Lemmen, C. & Lengauer, T. (1997). Time-efficient flexible superposition of medium-sized molecules. *J Comput Aided Mol Des* **11**(4), 357-68.

- Lemmen, C. & Lengauer, T. (2000). Computational methods for the structural alignment of molecules. *J Comput Aided Mol Des* **14**(3), 215-32.
- Lemmen, C., Lengauer, T. & Klebe, G. (1998b). FLEXS: a method for fast flexible ligand superposition. *J Med Chem* **41**(23), 4502-20.
- Lengauer, T. & Rarey, M. (1996). Computational methods for biomolecular docking. *Current Opinion in Structural Biology* **6**(3), 402-406.
- Leo, A. J. (1993). Calculating log P_{Oct} from Structures. *Chemical Reviews* **93**(4), 1281-1306.
- Levitt, M. & Park, B. H. (1993). Water: now you see it, now you don't. *Structure* **1**, 223-226.
- Liljas, A., Kannan, K. K., Bergsten, P. C., Waara, I., Fridborg, K., Strandberg, B., Carlbom, U., Järup, L., Lövgren, S. & Petef, M. (1972). Crystal structure of human carbonic anhydrase C. *Nature New Biol* **235**, 131-137.
- Lindskog, S. (1997). Structure and mechanism of carbonic anhydrase. *Pharmacol Ther* **74**(1), 1-20.
- Lipinski, C. A., Lombardo, F., Dominy, B. W. & Feeney, P. J. (1997). Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced Drug Delivery Reviews* **23**, 3-25.
- Makino, S. & Kuntz, I. D. (1997). Automated Flexible Ligand Docking Method and Its Application for Database Search. *J Comp Chem* **18**(14), 1812-1825.
- Mangani, S. & Hakansson, K. (1992). Crystallographic studies of the binding of protonated and unprotonated inhibitors to carbonic anhydrase using hydrogen sulphide and nitrate anions. *Eur J Biochem* **210**(3), 867-71.
- Maren, T. H. (1960). A simplified micromethod for the determination of carbonic anhydrase and its inhibitors. *J Pharmacol Exp Ther* **130**, 26-29.
- Maren, T. H. (1987). Carbonic Anhydrase: General Perspectives and Advances in Glaucoma Research. *Drug Development Research* **10**, 255-276.
- Maren, T. H. (1995). The development of topical carbonic anhydrase inhibitors. *J Glaucoma* **4**, 49-62.
- Maren, T. H. & Conroy, C. W. (1993). A new class of carbonic anhydrase inhibitor. *J Biol Chem* **268**(35), 26233-9.
- Maren, T. H., Jankowska, L., Sanyal, G. & Edelhauser, H. F. (1983). The transcorneal permeability of sulfonamide carbonic anhydrase inhibitors and their effect on aqueous humor secretion. *Exp Eye Res* **36**, 457-480.
- Maren, T. H. & Wiley, C. E. (1968). The vitro activity of sulfonamides against red cell carbonic anhydrase. Effect of ionic and substrate variation on the hydration reaction. *J Med Chem* **11**, 228-232.

- Markush, E. A. (1924). class of novel pyrolazone dyes. In *U.S. Patents*, USA.
- Martin, Y. C., Bures, M. G., Danaher, E. A., DeLazzer, J., Lico, I. & Pavlik, P. A. (1993). A fast new approach to pharmacophore mapping and its application to dopaminergic and benzodiazepine agonists. *J Comput Aided Mol Des* **7**(1), 83-102.
- Maryanoff, B. E., Costanzo, M. J., Nortey, S. O., Greco, M. N., Shank, R. P., Schupsky, J. J., Ortegon, M. P. & Vaught, J. L. (1998). Structure-activity studies on anticonvulsant sugar sulfamates related to topiramate. Enhanced potency with cyclic sulfate derivatives. *J Med Chem* **41**, 1315-1343.
- McMartin, C. & Bohacek, R. S. (1997). QXP: powerful, rapid computer algorithms for structure-based drug design. *J Comput Aided Mol Des* **11**(4), 333-44.
- Meng, E. C., Gschwend, D. A., Blaney, J. M. & Kuntz, I. D. (1993). Orientational sampling and rigid-body minimization in molecular docking. *Proteins* **17**(3), 266-78.
- Merz, K. M. (1991). Determination of pK_as of ionizable groups in proteins: the pK_a of Glu7 and 35 in hen egg lysozyme and Glu 106 in human carbonic anhydrase II. *J Am Chem Soc* **113**, 3572-3575.
- Merz, K. M. & Banci, L. (1997). Binding Of Bicarbonate to Human Carbonic Anhydrase II - a Continuum of Binding States. *Journal of the American Chemical Society* **119**(5), 863-871.
- Moriguchi, I., Hirono, S., Nakagome, I. & Hirano, H. (1994). Comparison of Reliability of log P Values for Drugs Calculated by Several Methods. *Chem Pharm Bull* **42**(4), 976-978.
- Moriguchi, I., Hirono, S., Qian, L., Nakagome, I. & Matsushita, Y. (1992). Simple Method of Calculating Octanol/Water Partition Coefficient. *Chem Pharm Bull* **40**(1), 127-130.
- Morris, G. M., Goodsell, D. S., Huey, R. & Olson, A. J. (1996). Distributed Automated Docking of Flexible Ligands to Proteins - Parallel Applications of Autodock 2.4. *Journal of Computer-Aided Molecular Design* **10**(4), 293-304.
- Muegge, I., Martin, Y. C., Hajduk, P. J. & Fesik, S. W. (1999). Evaluation of PMF scoring in docking weak ligands to the FK506 binding protein. *J Med Chem* **42**(14), 2498-503.
- Murray, C. W., Auton, T. R. & Eldridge, M. D. (1998). Empirical scoring functions. II. The testing of an empirical scoring function for the prediction of ligand-receptor binding affinities and the use of Bayesian regression to improve the quality of the model. *J Comput Aided Mol Des* **12**, 503-519.

- Mutschler, E. (1997). *Arzneimittelwirkungen, Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie*, WVG, Stuttgart.
- Nair, S. K., Calderone, T. L., Christianson, D. W. & Fierke, C. A. (1991). Altering the Mouth Of a Hydrophobic Pocket Structure and Kinetics Of Human Carbonic Anhydrase Ii Mutants At Residue Val-121. *Journal of Biological Chemistry* **266**(26), 17320-17325.
- Nair, S. K. & Christianson, D. W. (1991a). Structural properties of human carbonic anhydrase II at pH 9.5. *Biochem Biophys Res Commun* **181**(2), 579-84.
- Nair, S. K. & Christianson, D. W. (1991b). Unexpected Ph-Dependent Conformation Of His-64 the Proton Shuttle Of Carbonic Anhydrase II. *Journal of the American Chemical Society* **113**(25), 9455-9458.
- Nair, S. K. & Christianson, D. W. (1993). Structural Consequences Of Hydrophilic Amino Acid Substitutions In the Hydrophobic Pocket Of Human Carbonic Anhydrase Ii. *Biochemistry* **32**(17), 4506-4514.
- Nair, S. K., Elbaum, D. & Christianson, D. W. (1996). Unexpected binding mode of the sulfonamide fluorophore 5-dimethylamino-1-naphthalene sulfonamide to human carbonic anhydrase II. Implications for the development of a zinc biosensor. *Journal of Biological Chemistry* **271**(2), 1003-7.
- Nair, S. K., Krebs, J. F., Christianson, D. W. & Fierke, C. A. (1995). Structural basis of inhibitor affinity to variants of human carbonic anhydrase II. *Biochemistry* **34**(12), 3981-9.
- Najmanovich, R., Kuttner, J., Sobolev, V. & Edelman, M. (2000). Side-Chain Flexibility in Proteins Upon Ligand Binding. *Proteins* **39**, 261-268.
- Nissink, J. W. M., Verdonk, M. L., Kroon, J., Mietzner, T. & Klebe, G. (1997). Superposition of Molecules: Electron Density Fitting by Application of Fourier Transforms. *J Comp Chem* **18**, 638-645.
- Oprea, T. I. & Marshall, G. R. (1998). Receptor-Based Prediction of Binding Affinities. In *3D QSAR in Drug Design - Ligand-Protein Interactions and Molecular Similarity* (Kubinyi, H., Folkers, G. & Martin, Y. C., eds.), Vol. 2. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Otting, G., Liepinsh, E. & Wüthrich, K. (1991). Protein hydration in aqueous solution. *Science* **254**, 974-980.
- Otwinowski, Z. (1993). DENZO. Yale University, New Have, CT, USA.
- Patterson, D. E., Cramer, R. D., Ferguson, A. M., Clark, D. E. & Weinberger, L. E. (1996). Neighborhood Behavior: A Useful Concept for Validation of "Molecular Diversity" Descriptors. *J Med Chem* **39**, 3049-3059.

- Pearson, W. R. & Lipman, D. J. (1988). Improved tools for biological sequence comparison. *Proc Natl Acad Sci* **85**(8), 2444-2448.
- Pfeiffer, N. (1998). Modern pharmacological Glaucoma Therapy. *Dt Ärztebl* **95**(51), 3292-3297.
- Pocker, Y. & Stone, J. T. (1967). The Catalytic Versatility of Erythrocyte Carbonic Anhydrase. III. Kinetic Studies of the Enzym-Catalyzed Hydrolysis of p-Nitorphenyl Acetate. *Biochemistry* **6**(3), 668-678.
- Ponticello, G. S., Freedman, M. B., Habecker, C. N., Lyle, P. A., Schwam, H., Varga, S. L., Christy, M. E., Randall, W. C. & Baldwin, J. J. (1987). Thienothiopyran-2-sulfonamides: a novel class of water-soluble carbonic anhydrase inhibitors. *J Med Chem* **30**(4), 591-7.
- Poornima, C. S. & Dean, P. M. (1995a). Hydration in drug design. 1. Multiple hydrogen-bonding features of water molecules in mediating protein-ligand interactions. *J Comput Aided Mol Des* **9**(6), 500-12.
- Poornima, C. S. & Dean, P. M. (1995b). Hydration in drug design. 3. Conserved water molecules at the ligand- binding sites of homologous proteins. *J Comput Aided Mol Des* **9**(6), 521-31.
- Prugh, J. D., Hartman, G. D., Mallorga, P. J., McKeever, B. M., Michelson, S. R., Murcko, M. A., Schwam, H., Smith, R. L., Sondey, J. M., Springer, J. P. & *et al.* (1991). New isomeric classes of topically active ocular hypotensive carbonic anhydrase inhibitors: 5-substituted thieno[2,3-b]thiophene-2- sulfonamides and 5-substituted thieno[3,2-b]thiophene-2-sulfonamides. *J Med Chem* **34**(6), 1805-18.
- Puscas, I. & Buzas, G. (1986). Treatment of duodenal ulcers with ethoxzolamide, an inhibitor of gastric mucosa carbonic anhydrase. *Int J Clin Pharmacol Ther Toxicol* **24**(2), 97-9.
- Rarey, M., Kramer, B. & Lengauer, T. (1999a). Docking of hydrophobic ligands with interaction-based matching algorithms. *Bioinformatics* **15**(3), 243-250.
- Rarey, M., Kramer, B. & Lengauer, T. (1999b). The particle concept: placing discrete water molecules during protein-ligand docking predictions. *Proteins* **34**(1), 17-28.
- Rarey, M., Kramer, B., Lengauer, T., Claussen, H., Lemmen, C., Hiller, C., Sonnenburg, F. & Zimmermann, M. (2000). FlexX, Prediction of protein-ligand interactions 1.8.1 edit. GMD, Germany, Sankt Augustin, Deutschland.
- Rarey, M., Kramer, B., Lengauer, T. & Klebe, G. (1996a). A Fast Flexible Docking Method Using an Incremental Construction Algorithm. *Journal of Molecular Biology* **261**(3), 470-489.

- Rarey, M., Wefing, S. & Lengauer, T. (1996b). Placement of medium-sized molecular fragments into active sites of proteins. *Journal of Computer Aided Molecular Design* **10**(1), 41-54.
- Rosenfeld, R., Vajda, S. & Delisi, C. (1995). Flexible Docking and Design [Review]. *Annual Review of Biophysics & Biomolecular Structure* **24**, 677-700.
- Roughton, F. J. W. (1935). Recent work on carbon dioxide transport by the blood. *Physiol. Rev.* **15**, 241-296.
- Sadowski, J. (1997). A Hybrid Approach For Addressing Ring Flexibility in 3d Database Searching. *Journal of Computer-Aided Molecular Design* **11**(1), 53-60.
- Scholz, T. H., Sondey, J. M., Randall, W. C., Schwam, H., Thompson, W. J., Mallorga, P. J., Sugrue, M. F. & Graham, S. L. (1993). Sulfonylmethanesulfonamide inhibitors of carbonic anhydrase. *J Med Chem* **36**(15), 2134-41.
- Scolnick, L. R., Clements, A. M., Liao, J., Crenshaw, L., Hellberg, M., May, J., Dean, T. R. & Christianson, D. W. (1997). Novel binding mode of hydroxamate inhibitors to human carbonic anhydrase II. *J Am Chem Soc* **119**, 850-851.
- Scozzafava, A. & Supuran, C. T. (1998). Carbonic anhydrase inhibitors: ureido and thioureido derivatives of aromatic sulfonamides possessing increased affinities for isozyme I. A novel route to 2,5-disubstituted-1,3,4-thiadiazoles via thioureas, and their interaction with isozymes I, II and IV. *J Enzyme Inhib* **13**(2), 103-23.
- Shank, R. P., Gardocki, J. F., Vaught, J. L., Davis, C. B., Schupsky, J. J., Raffa, R. B., Dodgson, S. J., Nortey, S. O. & Maryanoff, B. E. (1994). Topiramate: preclinical evaluation of structurally novel anticonvulsant. *Epilepsia* **35**(2), 450-60.
- Shepard, K. L., Graham, S. L., Hudcosky, R. J., Michelson, S. R., Scholz, T. H., Schwam, H., Smith, A. M., Sondey, J. M., Strohmaier, K. M., Smith, R. L. & *et al.* (1991). Topically active carbonic anhydrase inhibitors. 4. [(Hydroxyalkyl)sulfonyl]benzene and [(hydroxyalkyl)sulfonyl]thiophenesulfonamides. *J Med Chem* **34**(10), 3098-105.
- Silver, L. H. (1998). Clinical efficacy and safety of brinzolamide (Azopt), a new topical carbonic anhydrase inhibitor for primary open-angle glaucoma and ocular hypertension. Brinzolamide Primary Therapy Study Group. *Am J Ophthalmol* **126**(3), 400-8.
- Silverman, D. N. & Lindskog, S. (1988). The catalytic mechanism of carbonic anhydrase: implications of a rate-limiting protolysis of water. *Accounts of Chemical Research* **21**, 30-36.

- Silverman, D. N., Tu, C. & Wynns, G. C. (1976). Depletion of ^{18}O from C^{18}O_2 in erythrocyte suspensions. The permeability of the erythrocyte membrane to CO_2 . *J Biol Chem* **251**(14), 4428-35.
- Smith, G. M., Alexander, R. S., Christianson, D. W., McKeever, B. M., Ponticello, G. S., Springer, J. P., Randall, W. C., Baldwin, J. J. & Habecker, C. N. (1994). Positions of His-64 and a bound water in human carbonic anhydrase II upon binding three structurally related inhibitors. *Protein Sci* **3**(1), 118-25.
- Sobolev, V., Wade, R. C., Vriend, G. & Edelman, M. (1996). Molecular docking using surface complementarity. *Proteins* **25**(1), 120-129.
- Stams, T., Chen, Y., Boriack-Sjodin, P. A., Hurt, J. D., Liao, J., May, J. A., Dean, T., Laipis, P., Silverman, D. N. & Christianson, D. W. (1998). Structures of murine carbonic anhydrase IV and human carbonic anhydrase II complexed with brinzolamide: molecular basis of isozyme-drug discrimination. *Protein Sci* **7**(3), 556-63.
- Sugrue, M. F., Gautheron, P., Mallorga, P., Nolan, T. E., Graham, S. L., Schwam, H., Shepard, K. L. & Smith, R. L. (1990). L-662,583 is a topically effective ocular hypotensive carbonic anhydrase inhibitor in experimental animals. *Br J Pharmacol* **99**(1), 59-64.
- Supuran, C. T. & Scozzafava, A. (2000). Carbonic anhydrase inhibitors and their therapeutical potential. *Exp. Opin. Ther. Patents* **10**(5), 575-600.
- Surgrue, M. F. (2000). Pharmacological and ocular hypotensive properties of topical carbonic anhydrase inhibitors. *Progr Ret Eye Res* **19**, 87-112.
- Surgue, M. F., Harris, A. & Adamsons, I. (1997). Dorzolamidehydrochloride: a topically active, carbonic anhydrase inhibitor the treatment of glaucoma. *Drugs of Today* **33**(5), 283-298.
- Swenson, E. R., Robertson, H. T. & Hlastala, M. P. (1993). Effects of carbonic anhydrase inhibition on ventilation-perfusion matching in the dog lung. *J Clin Invest* **92**(2), 702-9.
- Tame, J. R. (1999). Scoring functions: a view from the bench. *J Comput Aided Mol Des* **13**(2), 99-108.
- Taylor, R. (1995). Simulation Analysis of Experimental Design Strategies for Screening Random Compounds as Potential New Drugs and Agrochemicals. *J Chem Inf Comput Sci* **35**, 59-67.
- Thews, G., Mutschler, E. & Vaupel, P. (1991). *Anatomie Physiologie Pathophysiologie des Menschen*, WVG, Stuttgart.

- Toba, S., Colombo, G. & Merz, K. M. (1999). Solvent Dynamics and Mechanism of Proton Transfer in Human Carbonic Anhydrase II. *J Am Chem Soc* **121**, 2290-2302.
- Tripos. (1999). Molecular Diversity Manager (SELECTOR) 6.6 edit. Tripos Inc., St. Louis, MO.
- Tripos. (2000a). SYBYL Molecular Modelling Package 6.5 edit. Tripos, Inc., St. Louis, MO.
- Tripos. (2000b). UNITY Chemical Information Software 4.1 edit. Tripos, Inc., St. Louis, MO.
- Verdonk, M. L., Cole, J. C. & Taylor, R. (1999). SuperStar: a knowledge-based approach for identifying interaction sites in proteins. *J Mol Biol* **289**(4), 1093-108.
- Verpoorte, J. A., Metha, S. & Edsall, J. T. (1967). Esterase Activities of Human Carbonic Anhydrase B and C. *J Biol Chem* **242**(18), 4221-4229.
- Voet, D. & Voet, J. G. (1992). *Biochemie*, VCH, Weinheim, Germany.
- Wade, R. C., Clark, K. J. & Goodford, P. J. (1993). Further Development of Hydrogen Bond Function for Use in Determining Energetically Favorable Binding Sites on Molecules of Known Structure. 1. Ligand Probe Groups with the Ability to Form Two Hydrogen Bonds. *J Med Chem* **36**(148-156).
- Wade, R. C. & Goodford, P. J. (1993). Further Development of Hydrogen Bond Function for Use in Determining Energetically Favorable Binding Sites on Molecules of Known Structure. 2. Ligand Probe Groups with the Ability to Form more Than Two Hydrogen Bonds. *J Med Chem* **36**, 148-156.
- Walters, W. P., Stahl, M. T. & Murcko, M. A. (1998). Virtual screening - an overview. *Drug Discovery Today* **3**(4), 160-178.
- Wang, J., Kollman, P. A. & Kuntz, I. D. (1999). Flexible Ligand Docking: A Multistep Strategy Approach. *Proteins* **36**, 1-19.
- Weiner, P. K. & Kollman, P. A. (1981). AMBER: Assisted Model Building with Energy Refinement. A General Program for Modeling Molecules and Their Interactions. *J Comp Chem* **2**(3), 287-303.
- Welch, W., Ruppert, J. & Jain, A. N. (1996). Hammerhead - Fast, Fully Automated Docking of Flexible Ligands to Protein Binding Sites. *Chemistry & Biology* **3**(6), 449-462.
- Westhead, D. R., Clark, D. E. & Murray, C. W. (1997). A comparison of heuristic search algorithms for molecular docking. *J Comput Aided Mol Des* **11**, 209-228.
- Wilner, A., Raymond, K. & Pollard, R. (1999). Topiramate and metabolic acidosis. *Epilepsia* **40**, 792-795.

-
- Wilson, E. (2000). Crystallize Proteins? Let the Robots Do it ! *Chemical & Engineering News* **78**(27), 27-27.
- Wistrand, P. J. (1951). Carbonic Anhydrase in the anterior uvea of the rabbit. *Acta Physiol Scand* **24**, 144-148.
- Woltersdorf, O. W., Jr., Schwam, H., Bicking, J. B., Brown, S. L., deSolms, S. J., Fishman, D. R., Graham, S. L., Gautheron, P. D., Hoffman, J. M., Larson, R. D. & *et al.* (1989). Topically active carbonic anhydrase inhibitors. 1. O-acyl derivatives of 6-hydroxybenzothiazole-2-sulfonamide. *Journal of Medicinal Chemistry* **32**(11), 2486-92.
- Xiang, S., Short, S. A., Wolfenden, R. & Carter, C. W. (1997). The structure of the Cytidine Deaminase-Product Complex Provides Evidence for efficient Proton Transfer and Ground-state Destabilization. *Biochemistry* **36**(4768-4774).

6 Danksagung

- Herrn Prof. Dr. Gerhard Klebe gilt mein besonderer Dank für die interessante Themenstellung, für die freundliche Unterstützung und ständige Diskussionsbereitschaft. Das Interesse und die Motivation haben sehr zum Fortschritt dieser Arbeit beigetragen.
- Dr. Milton Stubbs und Dr. Ulrich Grädler danke ich für die ausgezeichnete Unterstützung bei dem kristallographischen Teil dieser Arbeit und für die heitere und stimmungsvolle Zusammenarbeit.
- Dr. Christian Lemmen danke ich für die Einführung, stetige Unterstützung und Hilfsbereitschaft bei der Arbeit mit FLEXS und RIGFIT.
- Dr. Bernd Wendt danke ich für die Einführung in die Techniken des „Virtuellen Screenings“.
- Dr. Claudiu Supuran danke ich für die Einführung in die *in vitro*-Testung von Carboanhydrase-Inhibitoren.
- Marco Bocola und Peter Block danke ich für die tatkräftige Unterstützung bei der Durchführung und Auswertung der *in vitro*-Assays.
- Dr. Holger Gohlke und Oliver Krämer danke ich für die Hilfsbereitschaft und Unterstützung bei „programmier-technischen“ Problemen.
- Insgesamt geht ein Dank an das Team der Systemadministratoren: Marco Bocola, Markus Böhm, Dr. Holger Gohlke, Daniel Rauh und Stefan Schmitt.
- Christian Sohn danke ich für die Betreuung des Röntgendiffraktometers und des biochemischen Labors.
- Allen Arbeitskreis-Mitgliedern danke ich für das angenehme Arbeitsklima, die stetige Hilfsbereitschaft und die fachlichen Diskussionen.
- Frau Dr. Silke Grüneberg danke ich für das Korrekturlesen dieser Arbeit.
- Der größte Dank geht schließlich an meine liebe Frau Silke, die mich während der ganzen Zeit immer unterstützt und aufgemuntert hat.

Veröffentlichungen

Aus der vorliegenden Arbeit sind bisher folgende Publikationen und Posterbeiträge hervorgegangen:

Sven Grüneberg, Bernd Wendt und Gerhard Klebe

Sub-Nanomolare Inhibitoren aus dem Computerscreening: Eine Modellstudie an der humanen Carboanhydrase II.

Angew. Chem. **2001**, *113/2*, 404-408

Sven Grüneberg, Bernd Wendt und Gerhard Klebe

Sub-nanomolar Inhibitors From Computer Screening: A Model Study Using Human Carbonic Anhydrase II.

Angew. Chem. Int. Ed. **2001**, *40*, 389-393

Gerhard Klebe, Ulrich Grädler, Sven Grüneberg, Oliver Krämer, Holger Gohlke

Understanding Receptor-Ligand Interactions as a Prerequisite for Virtual Screening.

in *Virtual Screening for Bioactive Molecules*, Eds. H.J. Böhm and G. Schneider, *Methods and Principles in Medicinal Chemistry, Vol.10*, Eds. Mannhold, H. Kubinyi, H. Timmerman, Wiley-VCH, (2000)

Sven Grüneberg, Bernd Wendt and Gerhard Klebe

Human Carbonic Anhydrase II: A Target for successful Virtual Screening.

Posterbeitrag, *13th European Symposium on Quantitative Structure-Activity Relations*, Düsseldorf, Deutschland (2000)

Sven Grüneberg, Bernd Wendt and Gerhard Klebe

Human Carbonic Anhydrase II: A Target for successful Virtual Screening.

Posterbeitrag, *5th International Conference on the Carbonic Anhydrases*, Port Townsend, Seattle WA, USA (2000)

Lebenslauf

Sven Grüneberg

Wilhelm-Roser-Str.9
35037 Marburg

- 05.10.1968 Geboren in Marburg/Lahn
- 08/1975 - 06/1979 Grundschule II, Homberg/Efze
08/1979 - 06/1988 Theodor-Heuss-Gymnasium, Homberg/Efze
- 06/1988 - 06/1990 Bundeswehr (Reserveoffizier), Kassel
- 10/1990 – 05/1996 Studium der Chemie, Philipps-Universität Marburg
12/1995 – 05/1996 Diplomarbeit unter Anleitung von Prof. Schubert, Prof. Röhms und Prof. Frenking bei Hoechst Marion Roussel AG in Frankfurt am Main: *Untersuchung von Wechselwirkungen nicht-nukleosidischer Inhibitoren mit der Reversen Transkriptase des humanen Immundefizienz Virus (HIV-1 RT).*
- 31.05.1996 Studienabschluß als Diplom Chemiker
- 09/1996 – 02/1997 Forschungsaufenthalt am Max-Planck Institut für Biochemie, Abteilung Strukturforschung bei Nobelpreisträger Prof. Huber, München
- 04/1997 – heute Anfertigung der Promotionsarbeit unter Anleitung von Prof. Klebe am Institut für Pharmazeutische Chemie, Philipps-Universität Marburg
- 04/1997 – 09/2000 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Pharmazeutische Chemie, Betreuung des Studentenpraktikums im ersten Semester (Qualitative Anorganische und Analytische Chemie) und sechsten Semester (Pharmazeutische Biochemie)

ERKLÄRUNG

Ich versichere, daß ich meine Dissertation

„Computergestützte Leitstruktursuchen in Moleküldatenbanken am Beispiel der humanen Carboanhydrase II“

selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg, den _____

Sven Grüneberg